# Antibiotika

# aus den Streptomycetenstämmen Tü 1306 und Tü 1374

Untersuchungen zur Isolierung,
Charakterisierung und Wirkungsweise

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MARTINA SCHNAIDT
geb. Botzenhart
aus Ulm-Söflingen

1978

78 373

# Antibiotika

## aus den Streptomycetenstämmen Tü 1306 und Tü 1374

Untersuchungen zur Isolierung,
Charakterisierung und Wirkungsweise

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MARTINA SCHNAIDT
geb. Botzenhart
aus Ulm-Söflingen

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 1978

Dekan: Professor Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Loeffler

Gesamtherstellung: aku - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

"Die Haltung zu einer derartigen Arbeit kann nicht Enthusiasmus, sondern nur ein unermüdliches Trotzdem sein."

H. Zähner

Aus: Schwäbische Zeitung, Ulm, 19.6.1975 (Nr. 137).

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hans Zähner danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung.

Für die Bestätigung der Identität der Substanzen 1306 I A und B mit Tirandamycin A und B mit Hilfe der Massen- und Kernresonanzspektroskopie und für die Durchführung der Versuche zur Komplexbildung der Tirandamycine danke ich Herrn K. H. Jaschke, Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen.

Herrn D. Neubauer und Herrn J. Sauerbier, Institut für Mikrobiologie I, danke ich für die Durchführung der 2oo l - Fermentation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Edda Fiedler für die sehr sorgfältige Anfertigung der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Mikrobiologie möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|---|---|
| ATCC | American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA |
| CBS | Central Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande |
| CM | Medium für Clostridium pasteurianum |
| CMA | Corn-Meal-Agar |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| DC | Dünnschichtchromatogramm |
| Eh | Einheiten |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| ETH | Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz |
| $Fe\text{-}(Tir.\ B)_2$ | Tirandamycin B - Eisenkomplex |
| HA | Medium für Streptomyceten |
| MA | Malzagar |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| NB | Nutrient Broth |
| NCIB | National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland |
| NCTC | National Collection of Type Culture, London, GB |
| NL | Nährlösung |
| N-Quelle | Stickstoffquelle |
| Sp | Spur |
| Tü | Stammsammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie I der Universität Tübingen |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| v/v | Verhältnis von Volumenteilen |
| Zt | Zimmertemperatur |

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | Seite |
|---|---|
| 1. E I N L E I T U N G | 1 |
| 1.1. SCREENING MIT BESONDERS EMPFINDLICHEN TESTORGANISMEN | 2 |
| 1.2. SCREENING MIT EINEM SPEZIELLEN TESTORGANISMUS | 2 |
| 2. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N | 4 |
| 2.1. CHEMIKALIEN | |
| 2.1.1. Nährlösungsbestandteile | 4 |
| 2.1.2. Materialien für Fermentation und Aufarbeitung | 4 |
| 2.1.3. Chemikalien für in vitro Versuche | 5 |
| 2.1.4. Radiochemikalien | 5 |
| 2.1.5. Antibiotika | 5 |
| 2.2. NÄHRMEDIEN | 6 |
| 2.2.1. Medien für die Optimierung der Antibiotika-produktion | 6 |
| 2.2.1.1. Komplexe Nährlösungen | 6 |
| 2.2.1.2. Chemisch definierte Nährlösungen | 6 |
| 2.2.2. Medien für Testorganismen | 7 |
| 2.3. MIKROORGANISMEN | 8 |
| 2.4. KULTURBEDINGUNGEN FÜR DIE PRODUZENTENSTÄMME | 10 |
| 2.4.1. Schüttelkulturen | 10 |
| 2.4.2. Fermentation im 200 l - Maßstab | 10 |
| 2.5. ISOLIERUNG UND REINIGUNG | 11 |
| 2.5.1. Isolierung und Anreicherung der Substanz aus Tü 1374 (Chartreusin) | 11 |
| 2.5.2. Isolierung und Reinigung der Substanzen aus Tü 1306 | 12 |
| 2.5.2.1. Isolierung und Anreicherung der Substanz 1306 II | 12 |
| 2.5.2.2. Isolierung und Reinigung von Substanz 1306 I A und B (Tirandamycin A und B) | 12 |
| 2.6. METHODEN ZUR BIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG | 13 |
| 2.6.1. Plattendiffusionstest | 13 |

Seite

2.6.2. Bioautographie 13
2.6.3. Wirkungsspektrum von Substanz 1306 II 13
2.6.4. Verdünnungsreihentest 14
2.6.5. Biophotometerversuche 14
2.6.6. DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo 15
2.6.7. RNS-Synthese in vitro 15
2.7. METHODEN ZUR CHEMISCHEN UND PHYSIKALISCHEN CHARAKTERISIERUNG 16
2.7.1. Dünnschichtchromatographie 16
2.7.2. Stabilitätsversuche 17
2.7.3. UV-Spektren 17
2.7.4. IR-Spektren 17

3. E R G E B N I S S E 18
3.1. SUBSTANZ AUS TÜ 1374 18
3.1.1. Produktion von Substanz 1374 18
3.1.2. Isolierung und Anreicherung 18
3.1.3. Identifizierung 20
3.2. ANTIBIOTIKA AUS TÜ 1306 22
3.2.1. Stammbeschreibung 22
3.2.2. Fermentation der Antibiotika aus Tü 1306 im 200 l - Fermenter 23
3.2.3. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Substanzen 1306 I A und B 25
3.2.3.1. Isolierung und Reinigung 25
3.2.3.2. Charakterisierung der Substanzen 1306 I A und B 29
3.2.3.3. Tirandamycinmetallkomplexe 33
3.2.3.4. Einfluß der Tirandamycine auf die RNS-Polymerasereaktion in vitro 37
3.2.4. Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von Substanz 1306 II 41
3.2.4.1. Produktion in synthetischen Medien (Schüttelkulturen) 41

Seite

3.2.4.2. Fermentation, Isolierung und Anreicherung von Substanz 1306 II 43
3.2.4.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung von Substanz 1306 II 45
3.2.4.4. Biologische Charakterisierung von Substanz 1306 II 50

4. D I S K U S S I O N 57
4.1. SCREENINGMODELLE 57
4.2. ZUR WIRKUNGSWEISE DER TIRANDAMYCINE 59
4.2.1. DNS-abhängige RNS-Polymerase und RNS-Synthese 60
4.2.2. Wirkung von Rifampicin, Streptolydigin und Tirandamycin auf die RNS-Polymerase 62
4.2.3. Vergleich der Hemmwirkung von Tirandamycin A und B mit anderen Antibiotika, die Tetramsäure als Strukturelement enthalten 69
4.3. ZUORDNUNG VON SUBSTANZ 1306 II ZU EINER ANTIBIOTIKAGRUPPE 75

5. Z U S A M M E N F A S S U N G 79

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 80

# 1. EINLEITUNG

Der Anwendungsbereich von Antibiotika hat sich seit Beginn der Forschung auf diesem Gebiet wesentlich erweitert (Goldberg, 1964). Dem ersten Einsatz bei bakteriellen Infektionen folgte bald die Verwendung bei der Lebensmittelkonservierung (Rembold, 1965a), der Tierernährung (Elliott, 1966; Jukes, 1971) und im Pflanzenschutz (Pramer, 1959; Goodman, 1966; Thirumalacher, 1968).
Neben den genannten Gebieten gibt es noch zahlreiche medizinische und nicht medizinische Bereiche, bei denen die Anwendung von Antibiotika oder genauer von mikrobiellen Metaboliten notwendig oder sinnvoll erscheint, für die jedoch keine oder wenig geeignete Substanzen zur Verfügung stehen (Zähner, 1977).
Das bedeutet, daß trotz der großen Zahl bekannter Antibiotika (4000 - 5000) auch heute noch ein Bedarf an diesen Substanzen besteht. Um diesem Bedarf nachzukommen, müssen jedoch neue Wege gesucht werden, da mit den bisher gebräuchlichen Methoden immer häufiger bereits bekannte Antibiotika wieder isoliert werden (Bérdy, 1974). Zur Diskussion stehen hier beispielsweise die chemische oder biologische Modifikation bekannter Antibiotika, veränderte oder neue Produkte durch Mutation der Produzentenstämme, der Einsatz spezifischer oder besonders empfindlicher Testkeime, die Verwendung zellfreier Systeme bestimmter Enzyme etc. (Zähner, 1977).
Zwei dieser Ansätze werden nachfolgend näher beschrieben, da sie die Grundlage dieser Arbeit bildeten.

## 1.1. SCREENING MIT BESONDERS EMPFINDLICHEN TESTORGANISMEN

Mit dieser Methode sucht man nach Antibiotika, die nur einzelne Keime oder einen kleinen Ausschnitt aus einer Mikroorganismengruppe hemmen.
Die Durchführung des Screenings erfolgt mit drei Testkeimen. Einer dieser Testkeime ist ein besonders empfindlicher Stamm (z.B. Streptomyces viridochromogenes Tü 57), zwei gehören zu den klassischen Testorganismen (z.B. Escherichia coli und Bacillus subtilis). Zur weiteren Bearbeitung werden die Substanzen ausgewählt, die nur bei dem empfindlichen Testkeim eine Hemmung aufweisen. Für einen Einsatz müssen diese als Engspektrumantibiotika bezeichneten Substanzen eventuell modifiziert werden, damit sie ein breiteres Wirkungsspektrum oder die sonst erwünschte Wirkung erlangen.

Man verzichtet bei der Auswahl dieser Substanzen bewußt auf eine Korrelation zu einer späteren Anwendung, sie soll nur die Auffindung unbekannter Antibiotika ermöglichen. Kirromycin (Wolf und Zähner, 1972) und Stenothricin (Zeiler, 1974) sind Antibiotika, die auf diese Weise gefunden wurden.

## 1.2. SCREENING MIT EINEM SPEZIELLEN TESTORGANISMUS

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Modell versucht man mit dieser Screeningmethode eine möglichst enge Korrelation zwischen erstem Test und späterer Anwendung herzustellen.
Seit etwa 1950 ist bekannt, daß die Beimischung geringer Mengen bestimmter Antibiotika zum Tierfutter die Wachstumsrate von Jungtieren steigert und gleichzeitig den Futtermittelbedarf senkt (Rembold, 1965b).

Aus wirtschaftlicher Sicht ist die Anwendung von Antibiotika auf diesem Gebiet wünschenswert. Bis heute werden jedoch zu diesem Zweck noch Substanzen eingesetzt, die in der Medizin als Therapeutika verwendet werden (z.B. Penicillin, Tetracyclin), was zu einer Verschärfung des Resistenzproblems beiträgt ("Swann-Report", 1969; Mercer et al., 1971; Walton, 1972; Smith, 1973).
Die Ursache für das Auftreten des nutritiven Effekts ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß als ein Grund die selektive Eliminierung toxinbildender Stämme der Gattung Clostridium aus der Darmflora der Tiere anzusehen ist (Lev et al., 1956; Lev, 1962; Ducluzeau et al., 1976).
Aus dieser Sicht schien es sinnvoll, ein Screening für Substanzen aufzubauen, die eine starke Hemmung bei Stämmen der Gattung Clostridium aufweisen. Andere grampositive Organismen sollten möglichst nicht, Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae auf keinen Fall gehemmt werden.
Als Testorganismen für dieses Screening dienen Clostridium pasteurianum, Bacillus subtilis, Streptomyces viridochromogenes Tü 57 und Escherichia coli. Für eine weitere Bearbeitung kommen solche Substanzen in Betracht, die bei Clostridium pasteurianum im Vergleich zu Bacillus subtilis und Streptomyces viridochromogenes eine signifikant stärkere Wirkung aufweisen, das Wachstum von Escherichia coli jedoch unbeeinträchtigt lassen.

Aufgabe dieser Arbeit war, aus zwei verschiedenen Streptomycetenstämmen (Tü 1374 und Tü 1306) Antibiotika zu isolieren und zu charakterisieren, die im Screening die erwähnten Eigenschaften aufwiesen. Da einer der Stämme (Tü 1306) eine weitere biologisch aktive Substanz bildet, sollte auch diese bearbeitet werden.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. CHEMIKALIEN

Mit Ausnahme der hier aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Präparate der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

### 2.1.1. Nährlösungsbestandteile

| | |
|---|---|
| Agar- Agar | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Calciumcarbonat gefällt rein | Fa. E. Merck AG, Darmstadt |
| Corn Meal Agar | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Distiller soluble | Strothmann-Brennereien, Minden |
| Fleischextrakt | Oxoid Ltd., London, GB |
| Fleischmehl | Ciba-Geigy, Basel, Schweiz |
| D-Glucose | Deutsche Maizenawerke, Hamburg |
| Hefeextrakt | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Magermilchpulver | Fa. Nestlé, Lindau |
| Malzextrakt | |
| für Fermentation | Löflund-Präparate, Dr. Fränkle u. Max Eck, Fellbach/Stuttgart |
| für Testplatten | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Mannit | Deutsche Maizenawerke, Hamburg |
| Nutrient Broth | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Sojamehl | Henselwerk, Magstadt/Stuttgart |

### 2.1.2. Materialien für Fermentation und Aufarbeitung

| | |
|---|---|
| Amberlite XAD-2, 300-1000 µ | Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg |
| Bio-Gel P2 100-200 mesh | Bio-Rad Laboratories, München |

| | |
|---|---|
| Celit | Fa. Hedinger. Stuttgart |
| Niax Polyol LHT 67 | Fa. Brenntag, Mühlheim/Ruhr |
| Sephadex LH-20 | Deutsche Pharmacia, Frankfurt |
| Tween 80 | Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg |

2.1.3. Chemikalien für in vitro Versuche

| | |
|---|---|
| ATP, CTP, GTP, UTP | Böhringer Mannheim GmbH, Mannheim |
| Kalbsthymus-DNS | " |
| DNS-abhängige RNS-Polymerase (aus E. coli) | " |
| Diphenyloxazol (PPO) | Zinsser Scintillators, Frankfurt |

2.1.4. Radiochemikalien

| | |
|---|---|
| (U-$^{14}$C) ATP | 558 mCi/mmol, 50 µCi/ml |
| L-(U-$^{14}$C) Isoleucin | 342 mCi/mmol, 50 µCi/ml |
| (2-$^{14}$C)Thymidin | 62 µCi/mmol, 52 µCi/ml |
| (5-$^{3}$H) Uracil | 1 Ci/mmol, 1 mCi/ml |

von Radiochemical Centre, Amersham, Großbritannien

2.1.5. Antibiotika

| | |
|---|---|
| Chartreusin | Prof. Dr. W. Keller-Schierlein, Zürich, Schweiz |
| α- und ß-Lipomycin | Dr. A. Zeeck, Göttingen |
| Oleficin | Prof. Horváth, Research Inst. for Pharm. Chem., Budapest, Ungarn |
| Streptolydigin und Streptolydiginderivate | Dr. A. Zeeck, Göttingen |

## 2.2. NÄHRMEDIEN

### 2.2.1. Medien für die Optimierung der Antibiotikaproduktion

#### 2.2.1.1. Komplexe Nährlösungen (NL)

Die Nummern geben die am Institut für Mikrobiologie I der Universität Tübingen gebräuchliche Bezeichnung an.

NL 19 — 2% Sojamehl, 2% Mannit, pH 7,5

NL 38 — 2% Malzextrakt, 2% Distiller soluble, 0,5% NaCl, 0,1% $NaNO_3$, pH 7,5

NL 43 — 2% Lactose, 2% Distiller soluble, 0,5% NaCl, 0,1% $NaNO_3$, pH 7,2

NL 111 — 2% Fleischmehl, 2% Malzextrakt, 1 % $CaCO_3$, pH 7,2

NL 62a — 4% Magermilchpulver, 1% Distiller soluble, pH 7,2

Die Medien wurden mit Leitungswasser angesetzt, die pH-Werte vor dem Autoklavieren eingestellt.

#### 2.2.1.2. Chemisch definierte Nährlösungen

Die nachfolgend aufgeführten Nährlösungskomponenten wurden nach der Graeco-Latin-Square-Methode (Auden et al., 1967) variiert.

C-Quellen:
Lactose, Stärke, Mannit — 20 g

Organische N-Quellen:
Glycin, Asparagin, Glutamin — 5 g

Anorganische N-Quellen:
Ammoniumsulfat, Harnstoff, Natriumnitrat — 1 g

Die Mengenangaben gelten für einen Liter 0,5-, 1- oder 2-fach konzentrierte Mineralsalzlösung.

Mineralsalzlösung (doppelt konzentriert)

| | |
|---|---|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2,0 g |
| $Ca(NO_3)_2$ | 2,0 g |
| $FeSO_4$ | 40 mg |
| $ZnSO_4$ | 10 mg |

in einem Liter 1/15 m Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,4

2.2.2. Medien für Testorganismen

Streptomyceten

Medium für Schrägagarkulturen und Testplatten
(verändert nach Pridham et al., 1956/57)

| | | |
|---|---|---|
| Hefeextrakt | 4,0 g | |
| Malzextrakt | 10,0 g | pH 7,3 |
| D-Glucose | 4,0 g | |
| Leitungswasser | 1,0 l | |

Clostridium pasteurianum

Medium für Verdünnungsreihentest und Testplatten

| | | |
|---|---|---|
| Fleischextrakt | 3,0 g | |
| Hefeextrakt | 3,0 g | |
| Malzextrakt | 3,0 g | |
| Pepton | 20,0 g | pH 7,0 |
| D-Glucose | 5,0 g | |
| (getrennt autoklavieren) | | |
| Ascorbinsäure | 0,2 g | |
| deionisiertes Wasser | 1,0 l | |

Bacillus subtilis und Escherichia coli

Chemisch definiertes Medium für Testplatten, Biophotometer- und Einbauversuche (verändert nach Davis und Mingioli, 1950)

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 3,0 g |
| $K_2HPO_4$ | 7,0 g |
| NaCl | 0,1 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,1 g |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,0 g |
| D-Glucose | 4,0 g |

(getrennt autoklavieren)

Medium für Verdünnungsreihentest (Ox-Medium)

| | | |
|---|---|---|
| Pepton | 10,0 g | |
| Fleischextrakt | 10,0 g | pH 7,2 |
| NaCl | 5,0 g | |
| Leitungswasser | 1,0 l | |

Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 15 g Agar/Liter zugesetzt.
Die pH-Werte wurden vor dem Autoklavieren eingestellt.

## 2.3. MIKROORGANISMEN

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden folgende Mikroorganismen verwendet:

Eubacteriales, gramnegativ

Achromobacter geminiani - Göttingen
Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Cohn - ATCC 11095
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12 W945, Köln
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12 W1485, Köln
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12 Po8H - Beck (1975)

Proteus vulgaris - NCTC 4157
Salmonella typhimurium LT2 (Loeffler) Castellani et Chalmers - Stocker, Stanford, University of California

Eubacteriales, grampositiv

Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips - ATCC 13344
Arthrobacter crystallopoietes Ensign et Ritterberg - ATCC 15481
Arthrobacter simplex (Jensen) Lochhead - NCIB 8929
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051
Bacillus subtilis - ATCC 6633
Brevibacterium flavum - ATCC 14067
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowson - ATCC 13659
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn - ATCC 398
Staphylococcus aureus Rosenbach - ETH 2070 Z

Pseudomonadales

Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525

Actinomycetales

Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici - Tü 57 (ETH 23575)

Pilze

Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125 (ETH 108)
Mucor hiemalis Wehmer (+) - Tü 179
Mucor hiemalis Wehmer (-) - Tü 180
Saprolegnia asterophora de Bary - CBS 180.44 +

## 2.4. KULTURBEDINGUNGEN FÜR DIE PRODUZENTENSTÄMME

### 2.4.1. Schüttelkulturen (Tü 1374 und Tü 1306)

500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich wurden mit 100 ml Nährlösung gefüllt, 20 Minuten bei 120°C autoklaviert und nach dem Abkühlen aus einem Schrägagarröhrchen beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C und 120 Upm auf einer rotierenden Schüttelmaschine.

### 2.4.2. Fermentation im 200 l - Maßstab (Tü 1306)

Die Anzucht des Streptomyceten erfolgte über 24 Stunden in Schüttelkulturen (NL 38). Danach wurden 2 Liter Kultur auf einen 20 l - Fermenter (Modell b 20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel, Fabrikation Giovanola Fréres S.A., Monthey, Schweiz) überimpft, der nach gleichfalls 24-stündiger Inkubation als Vorkultur für den 200 l - Fermenter (Modell b 200, s.o.) verwendet wurde. Als Fermentationsmedium diente Nährlösung 38, dem zur Unterbindung der Schaumentwicklung vor der Sterilisation (30 min., 121°C) einige Tropfen Polyol zugesetzt wurden. Die Inkubation der Fermenter erfolgte bei 27°C und 1200 Upm (Umwurfsystem), wobei in den 20 l - Fermenter 240 l Luft/Stunde, in den 200 l - Fermenter 3500 l Luft/Stunde eingeleitet wurden.
Zur Kontrolle der Fermentation wurden zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten Proben entnommen und nach folgenden Parametern ausgewertet:

1) pH-Wert der Kultur

2) Wachstum der Kultur
   Durch Zentrifugation der Kultur (10 ml, 10 min., 3000 Upm) in graduierten Zentrifugengläsern wurde die Zunahme des Sediments bestimmt.

3) Antibiotikabildung
   Die Antibiotikabildung wurde mit Hilfe des Plattendiffusionstests bestimmt.

## 2.5. ISOLIERUNG UND REINIGUNG

### 2.5.1. Isolierung und Anreicherung der Substanz aus Tü 1374 (Chartreusin)

Nach Erreichen des Produktionsmaximums wurde das Mycel über eine Nutsche abgetrennt, und das Kulturfiltrat über die Filterschicht U 1000 (Fa. Schenk, Filterbau, Schwäbisch Gmünd) nachgeklärt.
Der erste Reinigungsschritt führte über eine Amberlite XAD-2-Säule (Bettvolumen 1/10 des Filtratvolumens), wobei die gesamte biologische Aktivität an das Harz adsorbierte. Nach Waschen der Säule mit 5 Bettvolumina Wasser und 3 Bettvolumina Aceton/Wasser im Verhältnis 1:4 wurde die biologisch aktive Substanz mit Aceton/Wasser (1:1) eluiert.
Das Eluat wurde unter Vakuum bis auf den wässrigen Rückstand eingeengt, und anschließend bei pH 3 dreimal mit dem halben Volumen Äthylacetat extrahiert.

## 2.5.2. Isolierung und Reinigung der Substanzen aus Tü 1306

### 2.5.2.1. Isolierung und Anreicherung von Substanz 1306 II

Die Kultur wurde mit HCl auf pH 6 eingestellt, unter Zusatz von 2% Celit filtriert (Filterpresse Fa. Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd), und das Kulturfiltrat anschließend über die Filterschicht U 1000 nachgeklärt. Die klare Lösung wurde über eine Amberlite XAD-2-Säule gegeben (Bettvolumen 1/10 des aufzutragenden Volumens), die mit Wasser solange gewaschen wurde, bis der Durchlauf farblos war. Danach erfolgte die Desorption der Substanz mit Aceton/Wasser im Verhältnis 1:4. Das Eluat wurde unter Vakuum bis zum wässrigen Rückstand eingeengt, mit NaOH auf pH 9 eingestellt und dreimal mit 1/3 Volumen Chloroform extrahiert. Durch Ausziehen des Extraktes mit 0,01 N Ameisensäure konnte die antibiotische Aktivität wieder in die wässrige Phase gebracht werden. Eine weitere Abtrennung von Verunreinigungen war durch Chromatographie der wässrigen Phase an Bio-Gel P2 (100-200 mesh) in 0,01 N Ameisensäure möglich.

### 2.5.2.2. Isolierung und Reinigung von Substanz 1306 I A und B (Tirandamycin A und B)

Die Isolierung der Substanzen 1306 I A und 1306 I B verlief bis zur Adsorption an Amberlite XAD-2 analog der Aufarbeitung von Substanz 1306 II, jedoch ist zur Desorption dieser Antibiotika ein Aceton-Wasser-Verhältnis von 4:1 notwendig.
Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der wässrige Rückstand bei pH 3-4 mit Butanol/Äthylacetat (1:4) extrahiert (v/v). Der Extrakt wurde bis zur Trockene eingeengt, in Cloroform und ca. 1% Methanol aufgenommen und an Kieselgel 60 (70-230 mesh)

in Chloroform mit steigendem Methanolanteil chromatographiert. Hierbei wurde Substanz A mit ca. 20%, Substanz B mit ca. 50% Methanol eluiert. Der letzte Reinigungsschritt verlief bei Substanz A über eine Craigverteilung (220 Sufen) im Laufmittelsystem Tetrachlorkohlenstoff - Chloroform - Methanol - Wasser (42,5:7,5:40:10) (Jaschke, 1977), Substanz B wurde an Sephadex LH 20 in Methanol chromatographiert.

## 2.6. METHODEN ZUR BIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG

### 2.6.1. Plattendiffusionstest

Der Test (Zähner und Maas, 1972) wird zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung antibiotischer Aktivität in Lösungen verwendet.
Die Vorbereitung des Impfmaterials und die Herstellung der Testplatten ist für Bacillus subtilis bei Poralla (1967), für Clostridium pasteurianum bei Santo (1976) und für Streptomyces viridochromogenes bei Zeiler (1974) beschrieben.

### 2.6.2. Bioautographie

Mit dieser Methode ist es möglich, antibiotisch aktive Substanzen auf Dünnschichtchromatogrammen zu lokalisieren. Die Durchführung erfolgte nach Kirst (1971).

### 2.6.3. Wirkungsspektrum von Substanz 1306 II

Mit dem Plattendiffusionstest wurde die Wirkung von Substanz 1306 II auf verschiedene Mikroorganismen bestimmt.

Die Testorganismen wurden dafür in Flüssigmedium so lange inkubiert, bis sie bei 578 nm eine Extinktion von 0,5 erreicht hatten. Dies entspricht bei Bacillus subtilis einem Titer von ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Drautz, 1975). Mit 2 ml dieser Suspension wurden je 100 ml Agar beimpft. Die Testplatten wurden 16 Stunden inkubiert, Inkubationstemperatur und Testmedien sind im Ergebnisteil angegeben.
Prüflösung von Substanz 1306 II war ein konzentriertes Bio-Gel-Eluat, dessen Konzentration als 75 Einheiten definiert wurde.

### 2.6.4. Verdünnungsreihentest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika auf verschiedene Mikroorganismen wurde der Verdünnungsreihentest (Zähner und Maas, 1972) verwendet. Er wurde wie bei Weber (1976) beschrieben durchgeführt. Clostridium pasteurianum wurde im Anaerobiertopf (Fa. BBL-Gas Pak 100, Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg) inkubiert.

### 2.6.5. Biophotometerversuche

Für die Aufnahmen von Wachstumskurven wurde ein Biophotometer der Firma Jouan, Paris benützt.
Die Anzucht der Testorganismen erfolgte 16 - 18 Stunden in Flüssigkultur. Danach wurde auf frisches Medium überimpft und weiterinkubiert, bis die Bakteriensuspension eine Transmission von 90% (578 nm, d = 1 cm) erreicht hatte. Die Biophotometerküvetten wurden mit je 7,5 ml (bei Versuchen mit Clostridium pasteurianum 12 ml) dieser Suspension beimpft und im Biophotometer auf eine Transmission von 90% eingestellt. Bei maximaler Amplitude und Frequenz (bei Clostridium pasteurianum minimale Frequenz) des Magnetrührers

wurde so lange inkubiert, bis das Gerät eine Transmission von 70% anzeigte, danach erfolgte die Zugabe der Hemmstoffe.

### 2.6.6. DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo

Durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil bzw. Isoleucin in die entsprechenden Makromoleküle können diese Synthesen und ihre Hemmung durch Antibiotika im Testorganismus verfolgt werden.
Die Versuche wurden wie unter 2.6.5. beschrieben vorbereitet. Nachdem die Bakteriensuspension im Biophotometer eine Transmission von 75% erreicht hatte, wurden 10 µl $^{14}$C-Thymidin, 10 µl $^{3}$H-Uracil bzw. 5 µl $^{14}$C-Isoleucin und 10 µg kaltes Isoleucin pro Küvette (7,5 ml) zugegeben. Die Antibiotikazugabe erfolgte bei einer Transmission von 70%.
Zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten wurden jeweils 200 µl Probe entnommen und in 3 ml kalter 5%iger Trichloressigsäure gefällt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Proben durch Membranfilter (0,45 µ Porenweite, 25 mm Ø, Satorius Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt, dreimal mit 5%iger Trichloressigsäure gewaschen und anschließend getrocknet (45 min., 80°C). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in 5 ml Scintillationsflüssigkeit (4 g PPO in 1 l Toluol) mit einem Dreikanal-Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer (Mark II, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA).

### 2.6.7. RNS-Synthese in vitro

Die Verscuche zur Hemmung der RNS-Synthese in vitro wurden nach Fuchs et al. (1967) und wie bei Santo (1976) beschrieben durchgeführt.

Ein Testansatz von 250 µl enthielt 8 µg Kalbsthymus-DNS, je 1 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 0,25 µCi $^{14}$C-ATP, 0,03 M Trisacetat-Puffer, pH 7,9, 0,03 M $Mg^{++}$acetat, O,13 M $NH_4Cl$, 10 µl DNS-abhängige RNS-Polymerase und die im Ergebnisteil angegebenen Antibiotikamengen in Methanol.
Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.6.6. beschrieben.

## 2.7. METHODEN ZUR CHEMISCHEN UND PHYSIKALISCHEN CHARAKTERISIERUNG

### 2.7.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (Stahl, 1967) wurde zur Reinheitsprüfung während der verschiedenen Aufarbeitungsschritte und zur Identifizierung verwendet. Die Antibiotika wurden auf Kieselgel-Alufolien (Kieselgel 60 / Kieselgur, Schichtdicke 0,2 mm, F 254, Firma Merck, Darmstadt) in folgenden Laufmitteln aufgetrennt:

| | |
|---|---|
| Chloroform - Methanol | 80 : 20 oder 90 : 10 |
| Benzol - Methanol - Eisessig | 80 : 20 : 2,5 |
| Chloroform - Methanol - 25% $NH_3$ | 70 : 30 : 3 |
| Chloroform - Triäthylamin | 80 : 20 |

Die $R_f$-Werte der Antibiotika wurden mit Hilfe der Bioautographie ermittelt. Für präparative Zwecke wurden Kieselgelalufolien ohne Fluoreszenzindikator verwendet.

2.7.2. Stabilitätsversuche

Die Bestimmung der pH-Stabilität von Substanz 1306 II wurde mit dem wässrigen Rückstand des XAD-Eluats durchgeführt. pH-Werte und Temperaturen sind im Ergebnisteil aufgeführt. Für den Nachweis der Lichtempfindlichkeit wurde der Chloroformextrakt des Eluats verwendet. Er wurde bei Zimmertemperatur 12 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt, die Kontrolle im Dunkeln gehalten.

2.7.3. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden in einem Varian Techtron Spektralphotometer (Modell 635) aufgenommen. Die Lösungsmittel sind im Ergebnisteil angegeben.

2.7.4. IR-Spektren

IR-Spektren wurden in KBr in einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 137) aufgenommen.

# 3. E R G E B N I S S E

## 3.1. SUBSTANZ AUS TÜ 1374

Die biologisch aktive Substanz aus dem Streptomycetenstamm Tü 1374 wies im Screening die Charakteristika auf, die unter 1.1. genannt wurden: gute Hemmung des empfindlichen Testkeims Streptomyces viridochromogenes Tü 57, keine Hemmung von Bacillus subtilis und Escherichia coli auf komplexen Nährmedien.
Nachfolgend werden die Versuche zur Produktion, Isolierung und Identifizierung beschrieben.

### 3.1.1. Produktion von Substanz 1374

Die Antibiotikumbildung von Tü 1374 wurde in verschiedenen komplexen Nährmedien (2.2.1.1.) getestet, wobei die höchste Konzentration in Nährlösung 38 erzielt werden konnte.
Die Herstellung der Substanz erfolgte in Schüttelkulturen, die aus einem Schrägagarröhrchen beimpft worden waren. Das Produktionsmaximum wurde hierbei nach ca. 95 Stunden erreicht. Außer bei Tü 57 ließ sich auch bei Bacillus subtilis eine Hemmung nachweisen, allerdings nur auf chemisch definiertem Medium (Abb. 1). Da sehr viele Streptomycetenstämme gleichzeitig mehrere Antibiotika bilden, ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht entscheiden, ob die Hemmung der beiden Testorganismen auf eine oder zwei Substanzen zurückzuführen ist. Für nur eine Substanz spricht der gleiche Produktionsverlauf.

### 3.1.2. Isolierung und Anreicherung

Nach 95 Stunden Inkubationsdauer wurden die Kulturen geerntet. Das Mycel, das keine nachweisbaren Mengen

an Aktivität enthielt, wurde über eine Nutsche abgetrennt und verworfen. Die Anreicherung der Aktivität aus dem Kulturfiltrat erfolgte über Adsorption an Amberlite XAD-2, Elution mit Wasser/Aceton (1:1) und Extraktion des Eluats mit Äthylacetat.
Die Aktivität gegen Bacillus subtilis trat in allen Aufarbeitungsschritten gemeinsam mit der Aktivität gegen Tü 57 auf. Nach der Anreicherung über Amberlite XAD-2 konnte bei Bacillus subtilis eine Hemmung nicht nur auf chemisch definiertem sondern auch auf Komplexmedium nachgewiesen werden.

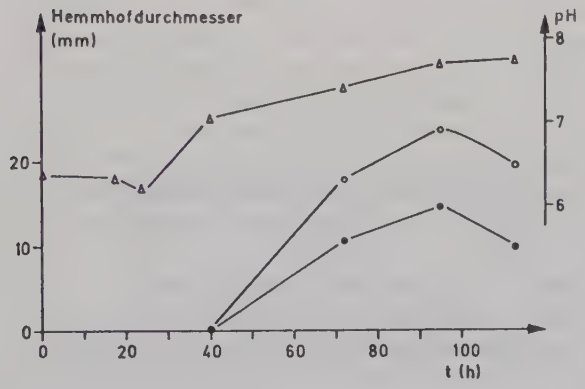



Abb. 1: Antibiotikumbildung und pH-Verlauf von Tü 1374 in Nährlösung 38

o———o Aktivität gegen Tü 57
●———● Aktivität gegen Bacillus subtilis (chemisch definiertes Medium)
Δ———Δ pH-Verlauf

### 3.1.3. Identifizierung

Der konzentrierte Äthylacetatextrakt wurde an Kieselgelalufolien im Fließmittelsystem Chloroform/Methanol (80:20) aufgetrennt, und das Chromatogramm mit Hilfe der Bioautographie entwickelt. Die Aktivität gegen Tü 57 und Bacillus subtilis deckte sich mit einer stark gelbgrün gefärbten Bande, die einen $R_f$-Wert von 0,6 aufwies. Die Hemmung der beiden Testorganismen war demnach nur auf ein Antibiotikum zurückzuführen, das nicht mehr dem geforderten Engspektrumkonzept entsprach.
Die Identifizierung der Substanz gelang durch die Aufnahme eines UV-Spektrums. Die gelbgrüne antibiotisch aktive Bande wurde hierfür aus dem Dünnschichtchromatogramm ausgekratzt, und die Substanz mit Methanol aus dem Kieselgel eluiert. Das mit diesem Material aufgenommene sichtbare und UV-Spektrum wies sehr charakteristische Maxima auf (Abb. 2), die bei der Durchsicht bekannter Spektren von Antibiotika (Umezawa, 1967) eindeutig auf CHARTREUSIN (Leach et al., 1953; Simonitsch et al., 1960; Strauss und Fleck, 1977) schließen ließen.
Diese Annahme konnte durch die Aufnahme eines IR-Spektrums (Abb. 3) und den direkten Vergleich (DC, UV-, IR-Spektrum) mit einer Chartreusinprobe bestätigt werden.

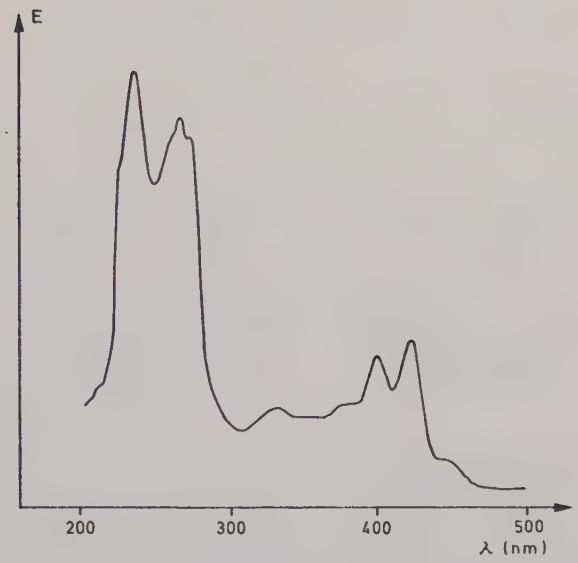



Abb. 2: Sichtbares- und UV-Spektrum von Substanz 1374 = Chartreusin

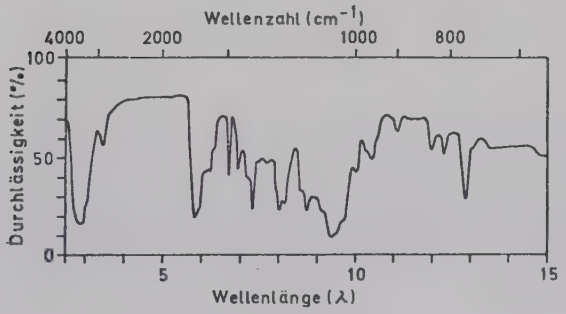



Abb. 3: IR-Spektrum von Substanz 1374 = Chartreusin

## 3.2. ANTIBIOTIKA AUS TÜ 1306

Der Stamm Tü 1306 wurde aus einem Screening für Antibiotika mit einem Wirkungsschwerpunkt gegen den Testorganismus Clostridium pasteurianum (1.2.) ausgewählt.
Wie die unter 3.2.2. aufgeführten Ergebnisse zeigen, besteht diese Aktivität aus zwei sehr eng verwandten Antibiotika, die zunächst als Substanz 1306 I A bzw. B bezeichnet werden. Neben diesen beiden Substanzen wird unter denselben Produktionsbedingungen ein weiteres Antibiotikum gebildet, das in Teil 3.2.3. beschrieben wird (Substanz 1306 II).

### 3.2.1. Stammbeschreibung

Tü 1306 wurde nach den Kriterien von Hütter (1967) bestimmt und weist folgende Merkmale auf:

1) Sporen ellipsoid, 0,7-2,0 x 0,7-1,8 µ groß mit flexiblen Stacheln.
2) Luftmycel anfangs kreideweiß, später weißgrau, in ausgereiftem Zustand aschgrau (cinereus).
3) Sporenketten monopodial verzweigt, Seitenäste in mehr oder weniger regelmäßigen Schrauben von meist 4 - 6 Windungen (Spira-Typ b).
4) Keine Melaninbildung auf peptonhaltigen Nährmedien.
5) Substratmycel grünbraun.

Der Stamm Tü 1306 wurde aufgrund dieser Merkmale als Streptomyces griseoflavus bestimmt und ist unter dieser Bezeichnung auch bei Pridham und Tresner (1975) aufgeführt.

### 3.2.2. Fermentation der Antibiotika aus Tü 1306 im 200 l - Fermenter

Die Durchführung der Fermentation im 200 l - Maßstab wurde unter 2.4.2. beschrieben.
Vergleicht man die Kurven der biologischen Aktivität gegen die Testorganismen Clostridium pasteurianum und Bacillus subtilis, so läßt sich ablesen, daß mindestens zwei Antibiotika gebildet werden (Abb. 4). Die maximale Konzentration beider Substanzen wird zwar etwa gleichzeitig erreicht, bei längerer Inkubation nimmt jedoch die Aktivität gegen Bacillus subtilis stark ab, während die Aktivität gegen Clostridium pasteurianum annähernd erhalten bleibt. Möglicherweise ist die geringe Abnahme der Hemmung von Clostridium pasteurianum auf den starken Abfall der biologischen Aktivität gegen Bacillus subtilis zurückzuführen.

Beide Substanzen erreichen schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Fermentation ihre höchste Konzentration (zwischen 24 und 30 Stunden). Da zumindest die Aktivität gegen Bacillus subtilis innerhalb weniger Stunden wieder stark abnimmt, schied der Plattendiffusionstest als Kriterium für die Beendigung der Fermentation aus. In allen Fällen war jedoch ein pH-Wert der Kultur zwischen 7,0 und 7,3 mit der maximalen Konzentration beider Antibiotika korreliert, und somit ein schneller und eindeutiger Nachweis für den Erntezeitpunkt gegeben.

Aufgrund des Screeningprogramms (1.2.) lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Isolierung und Charakterisierung der Aktivität gegen Clostridium pasteurianum (Substanz 1306 I). Sie wird daher zunächst beschrieben.

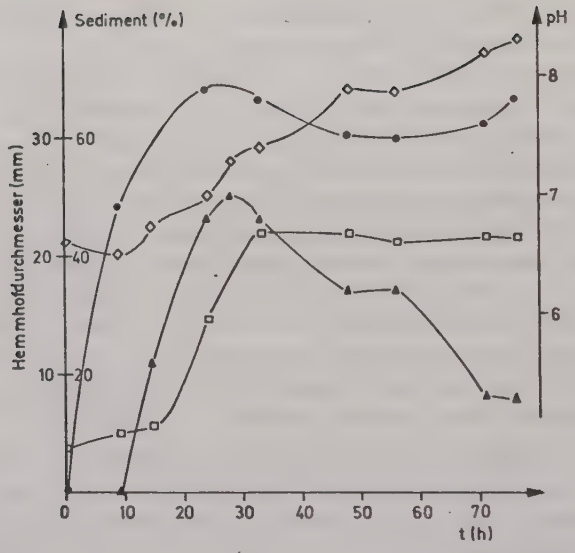



Abb. 4: Verlauf einer Fermentation im 200 l - Maßstab von Streptomyces griseoflavus (Tü 1306)

◇——◇ pH-Verlauf

□——□ Sediment

●——● Aktivität gegen Clostridium pasteurianum = Substanz 1306 I

▲——▲ Aktivität gegen Bacillus subtilis = Substanz 1306 II

### 3.2.3. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Substanzen 1306 I A und B

#### 3.2.3.1. Isolierung und Reinigung

##### 3.2.3.1.1. Isolierung und Reinigung aus Schüttelkulturen

Zur Isolierung und Reinigung wurden bis zur Chromatographie an Kieselgel die unter 2.5.2.2. aufgeführten Reinigungsschritte durchgeführt.
Durch die unterschiedlich starke Adsorption der Antibiotika an Amberlite XAD-2 konnte bereits im ersten Reinigungsschritt Substanz 1306 II von Substanz 1306 I abgetrennt werden. Über Chromtographie an Kieselgel ließ sich Substanz 1306 I in zwei Komponenten auftrennen, wobei Komponente A mit ca. 20% Methanol, Komponente B mit ca. 50% Methanol in Chloroform eluiert wurde. Das Rohprodukt A wurde zur Trockene eingeengt und in Methanol wieder aufgenommen. Hierbei blieb ein schwach gelb gefärbter unlöslicher Anteil zurück, der abfiltriert und mehrmals mit Methanol gewaschen wurde. Mit Chloroform konnte dieser Anteil wieder in Lösung gebracht werden, und der biologische Test zeigte, daß in ihm die Hauptmenge an antibiotischer Aktivität enthalten war.
Das Rohprodukt B wurde nach der Chromatographie an Kieselgel über Sephadex LH-20 in Methanol gegeben. Nach diesen Reinigungsschritten lagen die beiden Substanzen als chromatographisch einheitliche Produkte vor.

Der Vergleich (Dünnschichtchromatogramme, UV-Spektren, IR-Spektren, Wirkungsspektrum) der isolierten Komponenten A und B mit den von Santo (1976) aus Streptomyces flaveolus Tü 1240 isolierten auch stark gegen Clostridium pasteurianum wirksamen Antibiotika ließ eine Identität der Substanzen sehr wahrscheinlich erscheinen. Um für den Beweis der Identität mit Hilfe der Massen- und Kernresonanzspektroskopie genügend Material bereitzustellen, wurde im 200 l - Maßstab fermentiert.

### 3.2.3.1.2. Isolierung und Reinigung der Substanzen 1306 I A und B aus einer 200 l - Fermentation

Die Isolierung und Reinigung verlief bis zur Chromatographie an Kieselgel analog der Aufarbeitung aus Schüttelkulturen.
Im Gegensatz zu den Kieselgeleluaten aus Schüttelkulturen, die gelb gefärbt waren, wiesen die Eluate aus der 200 l - Fermentation jedoch eine rotbraune Färbung auf. Unterschiede in Bezug auf biologische Wirksamkeit oder chemisches Verhalten während der Reinigung konnten nicht festgestellt werden. Die weitere Reinigung der Kieselgeleluate und die Strukturaufklärung der Substanzen wurden von Jaschke (1977) durchgeführt.
Er konnte zeigen, daß es sich bei den vorliegenden Antibiotika um Eisenkomplexe handelt.
Um zu prüfen, ob die Eisenkomplexe bereits im Kulturfiltrat vorliegen oder erst während der Reinigung gebildet werden, wurden mit den Zwischenprodukten der Isolierung und Reinigung ESR-Messungen durchgeführt. Dadurch zeigte sich, daß Eisen erstmals im XAD-Eluat nachzuweisen war. Das unerwartete Auftreten des Eisens kann durch eine Verunreinigung des zur Verfügung stehenden XAD-Materials mit $FeCl_3$ erklärt werden.
Um die Struktur der Liganden der Eisenkomplexe mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie bestimmen zu können, mußte zunächst das Eisen entfernt werden. Dies gelang mit dem Komplexbildner Polyäthylenimin-5-Sulfonsäure-8-Hydroxychinolin (Jaschke, 1977).
Die eisenfreie Komponente A wurde danach über Craigverteilung, die Komponente B über Sephadex LH-20 in Methanol weitergereinigt.
Abbildung 5 zeigt das Reinigungsschema für die Substanzen 1306 I A und B. Es kann sowohl für die Reinigung der Antibiotika als Eisenkomplexe als auch für die freien Liganden angewendet werden.

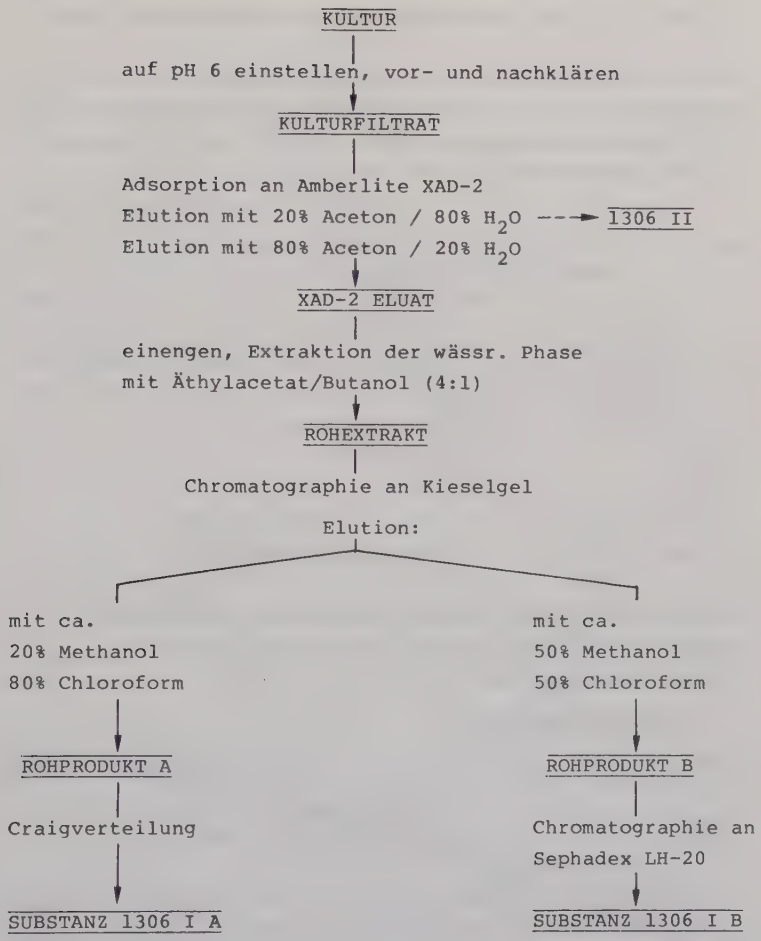



Abb. 5: Aufarbeitungsschema für die Substanzen
1306 I A und B

In Tabelle 1 ist die Bilanz der einzelnen Aufarbeitungsschritte aufgeführt. Der Berechnung wurde bis zur Auftrennung der beiden Komponenten die Steigung von Substanz 1306 I A (Abb. 6) zugrundegelegt. Das Vorhandensein des anderen Antibiotikums (Substanz 1306 II) im Kulturfiltrat wurde nicht berücksichtigt.

Tab. 1: Bilanz der einzelnen Reinigungsschritte für Substanz 1306 I A und B

| Reinigungschritt | Ausbeute (%) | Anreicherungsfaktor |
|---|---|---|
| Kulturfiltrat | 100 | 1 |
| XAD-Eluat | 98 | 78 |
| Extrakt | 88 | 85 |
| Kieselgeleluate | 68 | 335 |

Nach der Auftrennung der Antibiotika über Kieselgel entfallen 57% der Gesamtmenge auf Substanz 1306 I A, 43% auf Substanz 1306 I B.

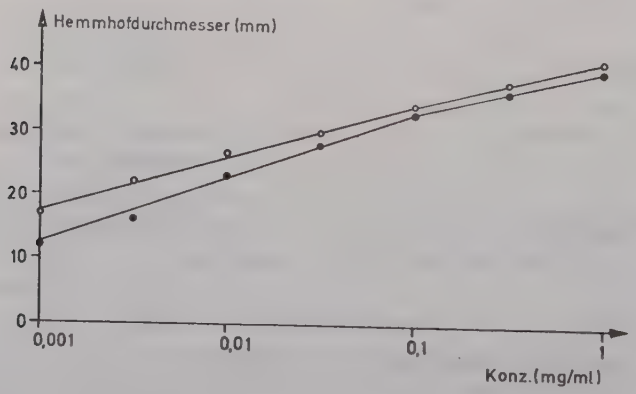



Abb 6: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Antibiotikumkonzentration im Plattendiffusionstest (Steigung) bei Clostridium pasteurianum

o———o Substanz 1306 I A

●———● Substanz 1306 I B

3.2.3.2. Charakterisierung der Substanzen 1306 I A und B

Die mit den freien Liganden durchgeführten Massen- und Kernresonanzspektren bestätigten den unter 3.2.3.1.1. geäußerten Verdacht, daß die aus Streptomyces griseoflavus Tü 1306 isolierten stark gegen Clostridium pasteurianum aktiven Antibiotika mit den beiden von Santo aus Streptomyces flaveolus Tü 1240 isolierten Substanzen identisch sind. Die Strukturaufklärung (Jaschke, 1977) ergab, daß es sich bei Substanz 1306 I A um das von Meyer (1971) und Mac Kellar et al. (1971) beschriebene Tirandamycin (Tirandamycin A) und bei Substanz 1306 I B um das von Santo (1976) und Hagenmaier et al. (1976) beschriebene Tirandamycin B handelt (Abb. 7).

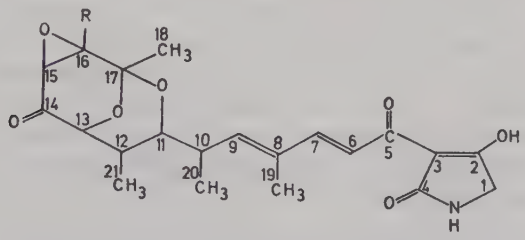



Abb. 7: Strukturformel der Tirandamycine

R = $CH_3$: Tirandamycin A
R = $CH_2OH$: Tirandamycin B

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Tirandamycine sind in den oben genannten Publikationen detailliert dargestellt. Diese Arbeit beschränkt sich auf die Beschreibung der Eigenschaften, die am Institut für Mikrobiologie I der Universität Tübingen zur Identifizierung und Charakterisierung herangezogen werden können.

3.2.3.2.1. Löslichkeit

Tirandamycin A (gelb) und Tirandamycin B (dunkelgelb) lösen sich in Methanol, Äthanol, chlorierten Kohlenwasserstoffen, Dimethylsulfoxid und Aceton. Unlöslich sind sie in n-Hexan und Wasser.

3.2.3.2.2. Dünnschichtchromatographie

Tirandamycin A und B wurden auf Kieselgel-Kieselgur-Alufolien in drei verschiedenen Laufmitteln chromatographiert.
In Tabelle 2 sind die $R_f$-Werte zusammengestellt. Die Detektion der Substanzen ist mit Hilfe der Bioautographie (Testorganismus Clostridium pasteurianum) und durch die Fluoreszenslöschung bei 254 nm möglich. In Laufmittelsystem 1 verfärben sich die Tirandamycine rötlichbraun, was wahrscheinlich auf einer Komplexierung mit dem in der Kieselgelschicht enthaltenen Eisen in saurem Milieu beruht. Dieses Laufmittel ist daher für Routinetests besonders gut geeignet.

Tab. 2: $R_f$-Werte der Tirandamycine in verschiedenen Laufmittelsystemen

| Laufmittelsystem | | $R_f$-Werte | |
|---|---|---|---|
| | | Tirandamycin A | Tirandamycin B |
| 1 Benzol | 80 | | |
| Methanol | 20 | 0,76 | 0,46 |
| Eisessig | 2,5 | | |
| 2 Chloroform | 90 | | |
| Methanol | 10 | 0,45 | 0,27 |
| 3 Benzol | 70 | | |
| Methanol | 30 | 0,47 | 0,35 |
| 25% $NH_3$ | 3 | | |

3.2.3.2.3. UV-Spektrum

Die UV-Spektren von Tirandamycin A und B sind nahezu identisch. In Abbildung 8 ist daher nur das Spektrum von Tirandamycin B in Äthanol und unter Zusatz von NaOH bzw. HCl dargestellt.

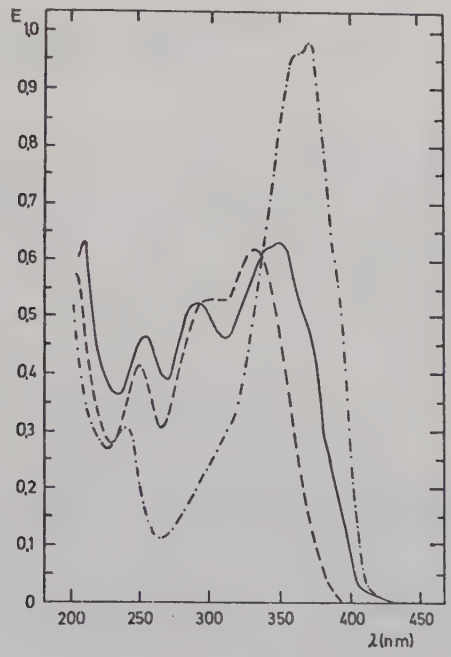



Abb. 8: UV-Spektrum von Tirandamycin B (0;02 mg/ml)
in Äthanol ————
in 0,01 N HCl in Äthanol -·-·-·-·-
in 0,01 N NaOH in Äthanol --------

3.2.3.2.4. IR-Spektren

Auch die IR-Spektren der Tirandamycine weisen nur geringfügige Unterschiede auf. Abbildung 9 zeigt das IR-Spektrum von Tirandamycin B.

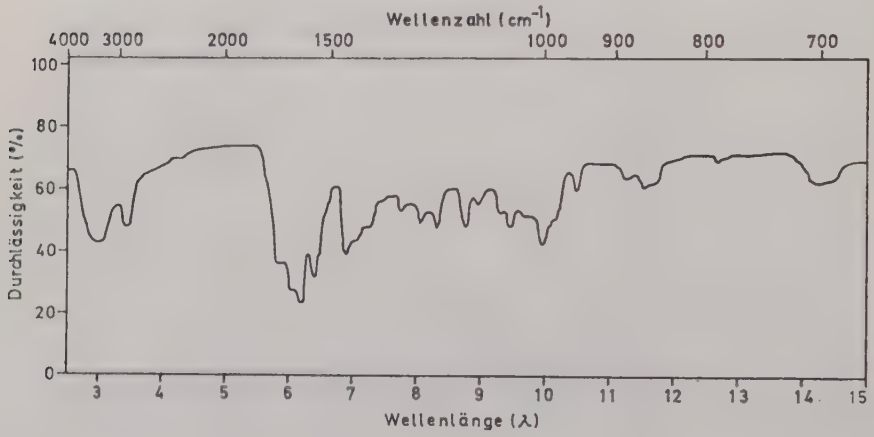



Abb. 9: IR-Spektrum von Tirandamycin B

### 3.2.3.3. Tirandamycinmetallkomplexe

Das komplexchemische Verhalten der Tirandamycine wurde am Beispiel von Tirandamycin B untersucht (Jaschke, 1977). Außer mit Eisen komplexiert Tirandamycin B auch mit Magnesium, Kupfer und Vanadium. Das Verhältnis Antibiotikum zu Metall beträgt jeweils 2:1.
In Abb. 10 ist dargestellt, wie ein Tirandamycinmetallkomplex angeordnet sein könnte.

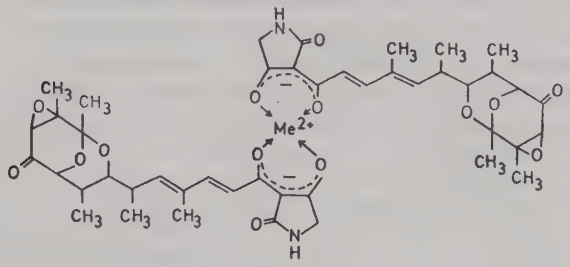



Abb. 10: Tirandamycinmetallkomplex

Wie die Abbildung zeigt, erfolgt die Komplexierung über den Tetramsäureteil des Tirandamycins. Da es eine ganze Reihe von Antibiotika gibt, die dieses Strukturelement enthalten (Kunze, 1975; Frobel, 1977), sollte auch ein Teil dieser Substanzen Metallkomplexe bilden können. Dies ist auch für Magnesidin (Ghandi et al., 1973; Kohl et al., 1974) und für Streptolydigin und seine Derivate (Frobel, 1977) beschrieben, die als Magnesiumkomplexe isoliert werden konnten.
Unter 3.2.3.1.2. wurde erwähnt, daß während der Isolierung und Reinigung der Tirandamycin-Eisenkomplexe keine Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit im Vergleich zu den eisenfreien Antibiotika festgestellt werden konnten. Mit Fe-(Tirandamycin B)$_2$ wurde dieses Ergebnis

durch Ermitllung der minimalen Hemmkonzentration im Biophotometer, mit einem Wirkungsspektrum und durch die Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase in vitro überprüft.

### 3.2.3.3.1. Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Fe-(Tirandamycin B)$_2$ im Biophotometer

Abb. 11 zeigt den Einfluß verschiedener Konzentrationen von Fe-(Tirandamycin B)$_2$ auf Clostridium pasteurianum bei Zugabe des Antibiotikums in der logarithmischen Wachstumsphase. Es ergaben sich nur unwesentliche Unterschiede im Vergleich zu den von Santo (1976) für Tirandamycin B ermittelten Werten.

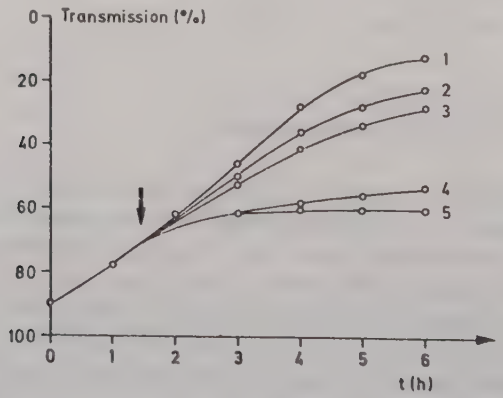



Abb. 11: Wirkung von Fe-(Tirandamycin B)$_2$ auf Clostridium pasteurianum. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an. Inkubationstemperatur 30°C.

1 Kontrolle
2 0,1 µg/ml
3 0,3 µg/ml
4 1,0 µg/ml
5 3,0 bzw. 10 µg/ml Fe-(Tirandamycin B)$_2$

3.2.3.3.2. Wirkungsspektrum

Im Verdünnungsreihentest wurden die minimalen Hemmkonzentrationen von Tirandamycin B im Vergleich zu Fe-(Tirandamycin B)$_2$ bei verschiedenen Mikroorganismen bestimmt. Die eingesetzten Antibiotikakonzentrationen betrugen 0,1, 1, 10 und 100 µg/ml. Wie Tabelle 3 zeigt, können auch hier praktisch keine Unterschiede in der Wirksamkeit festgestellt werden.

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentration von Tirandamycin B im Vergleich zu Fe-(Tirandamycin B)$_2$ bei verschiedenen Bakterien im Verdünnungsreihentest.

| Organismen | Temp. (°C) | MHK (µg/ml) Tir. B | Fe-(Tir. B)$_2$ |
|---|---|---|---|
| Eubacteriales, gramnegativ | | | |
| Achromobacter geminiani | 27 | >100 | 100 |
| Agrobacterium tumefaciens | 27 | 100 | 100 |
| Escherichia coli K12 W945 | 37 | >100 | >100 |
| Escherichia coli K12 W945 Po8H | 37 | >100 | >100 |
| Proteus vulgaris | 37 | >100 | 100 |
| Eubacteriales, grampositiv | | | |
| Arthrobacter aurescens | 27 | >100 | >100 |
| Arthrobacter crystallopoietes | 27 | >100 | >100 |
| Arthrobacter simplex | 27 | 100 | 100 |
| Bacillus brevis | 37 | 10 | 1 |
| Bacillus subtilis ATCC 6051 | 37 | 100 | 100 |
| Bacillus subtilis ATCC 6633 | 37 | 100 | 100 |
| Brevibacterium flavum | 27 | 100 | 100 |
| Clostridium pasteurianum | 30 | 1 | 1 |
| Corynebacterium poinsettiae | 27 | 100 | 100 |
| Micrococcus luteus | 27 | >100 | >100 |
| Staphylococcus aureus | 37 | 10 | 100 |

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten, die Frobel (1977) mit der Substanz $\alpha_3$-929 = Mg-(Streptolydigin)$_2$ erhielt.
Da in den Testmedien genügend Kationen für eine Komplexierung der Antibiotika vorhanden sind, wird sich im Medium unabhängig von der Form der Zugabe ein Gleichgewicht zwischen Komplex und freien Liganden einstellen. Ob das Gleichgewicht auf der Seite des Komplexes oder des freien Antibiotikums liegt, kann nicht entschieden werden, da bis jetzt für die Antibiotikummetallkomplexe weder Komplexbildungs- noch Komplexstabilitätskonstanten bestimmt wurden.

### 3.2.3.3.3. Einfluß von Fe-(Tirandamycin B)$_2$ auf die RNS-Synthese in vitro

Tirandamycin B hemmt die RNS-Synthese in vitro bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu etwa 50% (Santo, 1976). Eine unterschiedlich starke Wirkung von Fe-(Tirandamycin B)$_2$ in diesem zellfreien System hätte daher zu einer Klärung der Frage beitragen können, ob in der Zelle der Antibiotikumkomplex oder das metallfreie Antibiotikum wirksam ist. Wie Abbildung 12 zeigt, gibt es jedoch auch bei diesem Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen Fe-(Tirandamycin B)$_2$ und Tirandamycin B. Hierfür können ähnliche Gründe wie oben aufgeführt werden:

1) Der Antibiotikumkomplex dissoziiert weitgehend unter den Bedingungen des Testansatzes.

2) Tirandamycin komplexiert nach den Ergebnissen von Jaschke (1977) außer mit Eisen auch mit Magnesium. Da im Testansatz 0,03 M Magnesiumacetat enthalten sind, die höchste eingesetzte Antibiotikumkonzentration jedoch nur ca. 0,001 M beträgt, könnte eine Komplexierung von Tirandamycin B mit Magnesium erfolgen.

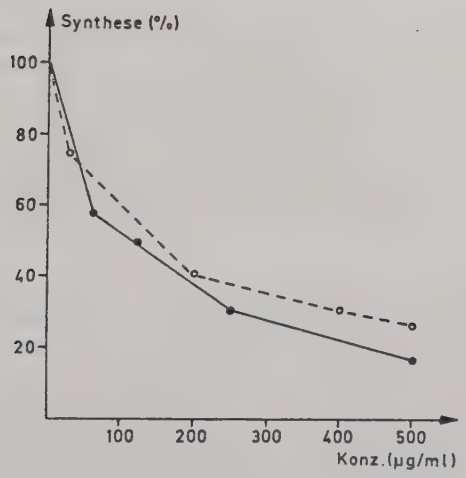



Abb. 12: Hemmung der RNS-Synthese in vitro durch

Tirandamycin B o------o

Fe-(Tirandamycin B)$_2$ ●——●

3.2.3.4. Einfluß der Tirandamycine auf die RNS-Polymerasereaktion in vitro

Tirandamycin A und B hemmen bei empfindlichen Bakterien nach den Versuchen von Santo (1976) die RNS-Synthese in vivo. Durch in vitro - Versuche mit DNS-abhängiger RNS-Polymerase aus Escherichia coli konnten diese Resultate gestützt werden (Santo, 1976; Reusser, 1970; Reusser, 1976). Zur genaueren Untersuchung des Angriffsortes wurden die Konzentrationen der an dieser Reaktion beteiligten Komponenten (DNS, Nucleotide, RNS-Polymerase) von beiden Autoren variiert.

Übereinstimmend fanden sie keine Beeinflussung der Hemmwirkung durch unterschiedliche DNS-Konzentrationen, was eine Wechselwirkung der Antibiotika mit DNS ausschließt. Ihre Ergebnisse unterscheiden sich jedoch bei der Variation der Polymerase- bzw. der Nucleotidkonzentration. So findet Reusser (1970;1976) eine verminderte Wirkung des Antibiotikums durch höhere Polymerasekonzentrationen, Santo (1976) durch höhere Nucleotidkonzentrationen. Eigene Versuche sollten zur Klärung dieser Differenz beitragen.

3.2.3.4.1. Einfluß der Polymerasekonzentration auf die Hemmwirkung von Tirandamycin A

Dieser Versuch enthielt die halbe, einfache und doppelte Polymerasekonzentration bezogen auf den normalen Testansatz (2.6.7.). Um mit den Resultaten von Reusser (1976) vergleichen zu können, wurden 200 µg/ml Tirandamycin A eingesetzt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.

Tab. 4: Einfluß der Polymerasekonzentration auf die Hemmwirkung von Tirandamycin A (200 µg/ml)

| Polymerasekonzentration | Hemmung (%) |
|---|---|
| 1/2 | 79 |
| 1 | 78 |
| 2 | 67 |

Übereinstimmend mit dem Ergebnis von Reusser (1976) konnte bei Verdopplung der RNS-Polymerasekonzentration eine Abnahme der Hemmwirkung von 11% erreicht werden.

3.2.3.4.2. Einfluß der Nucleotidkonzentration auf die Hemmwirkung von Tirandamycin B

Die Nucleotidkonzentration wurde für diesen Testansatz halbiert (0,5 mM) und verdoppelt (2 mM). Zur Hemmung der RNS-Polymerasereaktion wurden 125 µg/ml Tirandamycin B verwendet. Tabelle 5 zeigt, daß durch die Verdopplung der Nucleotidkonzentration die Hemmung durch Tirandamycin B um 24% reduziert werden kann. Santo erhielt unter gleichen Versuchsbedingungen eine Differenz von 23%.

Tab. 5: Einfluß der Nucleotidkonzentration auf die Hemmung der RNS-Polymerasereaktion durch Tirandamycin B (125 µg/ml)

| Nucleotidkonzentration (mM) | Hemmung (%) |
|---|---|
| 0,5 | 55 |
| 1 | 46 |
| 2 | 22 |

### 3.2.3.4.3. Einfluß der Konzentrationserhöhung einzelner Nucleotide auf die Hemmung der RNS-Polymerasereaktion durch Tirandamycin B

Diesem Versuch liegt der Gedanke zugrunde, daß die Hemmwirkung der Tirandamycine auf einer Konkurrenz mit einem der vier Nucleotide um die Bindungsstelle an der RNS-Polymerase beruhen könnte (Santo, 1976). Der Testansatz enthielt je drei Nucleotide in der halben (0,5 mM) und je ein Nucleotid in der doppelten Konzentration (2 mM). Die eingesetzte Antibiotikumkonzentration betrug 125 µg/ml Tirandamycin B. Tabelle 6 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Tab. 6: Einfluß der doppelten Konzentration einzelner Nucleotide auf die Hemmung der RNS-Polymerasereaktion durch Tirandamycin B (125 µg/ml)

| doppelte Konzentration | Hemmung (%) |
|---|---|
| UTP | 21 |
| ATP | 26 |
| CTP | 48 |
| GTP | 46 |

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Daten aus Tabelle 5, so zeigt sich, daß duch die Erhöhung der UTP-Konzentration die gleiche Abnahme der Hemmwirkung erreicht werden kann, wie durch die Konzentrationserhöhung aller Nucleotide. Der Einfluß von ATP liegt in der gleichen Größenordnung, während GTP und CTP keinen Effekt zeigen. In Teil 4. wird auf diese Ergebnisse näher eingegangen.

### 3.2.4. Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von Substanz 1306 II

Tü 1306 produziert neben Tirandamycin A und B ein weiteres Antibiotikum, das im Gegensatz zu den Tirandamycinen ein sehr breites Wirkungsspektrum besitzt. Chemisch gesehen handelt es sich bei dieser Substanz um eine orangegelb gefärbte lipophile Base, die sehr alkalilabil und lichtempfindlich ist. Nachfolgend werden die Versuche zur Isolierung und Charakterisierung dieses Antibiotikums beschrieben.

#### 3.2.4.1. Produktion in synthetischen Medien (Schüttelkulturen)

Substanz 1306 II wird unter denselben Fermentationsbedingungen wie die Tirandamycine gebildet. Eine Trennung der Substanzen ist über Amberlite XAD-2 bereits im ersten Reinigungsschritt möglich, danach wird die weitere Reinigung von Substanz 1306 II durch die Alkalilabilität und Lichtempfindlichkeit sehr erschwert. Häufig ergeben sich Vorteile bei der Reinigung, wenn anstelle von komplexen Medien chemisch definierte verwendet werden. Es wurde daher geprüft, ob Substanz 1306 II in definierten Medien, die nach dem Graeco-Latin-Square (Auden et al., 1967) variiert wurden, produziert wird.
In vier der neun getesteten Medien konnten mit NL 38 vergleichbare Antibiotikakonzentrationen erzielt werden. Das Produktionsmaximum wurde jedoch erst 36 - 48 Stunden später erreicht.
In Tabelle 7 sind die Zusammensetzung der vier Medien, der maximal erreichte Hemmhofdurchmesser und die dafür benötigte Inkubationszeit zusammengestellt.

Tab. 7: Produktion von Substanz 1306 II in vier chemisch definierten Medien

| Medium / Zusammensetzung | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| C-Quelle | Mannit | Stärke | Lactose | Mannit |
| Org. N-Quelle | Asparagin | Asparagin | Glutamin | Glutamin |
| Anorg. N-Quelle | Harnstoff | $NaNO_3$ | $NaNO_3$ | $(NH_4)_2SO_4$ |
| Salzkonzentrat. | 2-fach | 1-fach | 3-fach | 1-fach |
| Hemmhofdurchmesser (mm) | 17 | 20 | 19 | 24 |
| Inkubation (h) | 84 | 84 | 96 | 84 |

Gemeinsam ist diesen vier Medien Asparagin bzw. Glutamin als organische N-Quelle. Beide Substanzen sind als Substrate für eine Fermentation teuer. Es wurde daher versucht, Glutamin in Medium vier, in dem die höchste Antibiotikumkonzentration erreicht wurde, durch Glutaminsäure zu ersetzen. Dieser Austausch führte zu einer weiteren Verlängerung der Fermentationsdauer um ca. 2 1/2 Tage. Durch die Verwendung von $NaNO_3$ anstelle von $(NH_4)_2SO_4$ konnte die Inkubationszeit jedoch wieder auf 84 Stunden reduziert werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Einfluß der organischen und anorganischen N-Quellen auf die Fermentationsdauer von Substanz 1306 II

| Variation der N-Quellen in Medium 4 | Glutamin $(NH_4)_2SO_4$ | Glutaminsäure $(NH_4)_2SO_4$ | Glutaminsäure $NaNO_3$ |
|---|---|---|---|
| Hemmhofdurchmesser (mm) | 22 | 24 | 23 |
| Inkubationszeit (h) | 84 | 137 | 84 |

Ein Nachteil dieses Mediums im Vergleich zu NL 38 besteht in der verlängerten Fermentationsdauer. Schwierigkeiten ergaben sich außerdem bei der Bestimmung des Erntezeitpunktes, da auch in diesem Medium wie in NL 38 das Produktionsmaximum sehr schmal ist. Durch die starke Pufferung des Mediums konnte der pH-Wert der Kultur, der in NL 38 als Kriterium zur Ernte benutzt wurde, nicht herangezogen werden. Da entgegen der Erwartung auch die Reinigungsversuche nicht wesentlich günstiger ausfielen, wurde von einer Fermentation in diesem Medium abgesehen.

### 3.2.4.2. Fermentation, Isolierung und Anreicherung von Substanz 1306 II

Die Fermentation von Substanz 1306 II in NL 38 wurde zusammen mit den Tirandamycinen unter 3.2.2. beschrieben.
In Abbildung 13 sind die durchgeführten Schritte zur Isolierung und Anreicherung schematisch dargestellt.
Bei diesem Reinigungsverfahren treten beim zweiten Schritt, der Extraktion des wässrigen Rückstands des XAD-Eluats mit Chloroform, zwei Schwierigkeiten auf:

1) Die Extraktion ist nur aus alkalischem Milieu möglich, die Substanz ist jedoch alkalilabil (3.2.4.3.2.).
2) Die Substanz zersetzt sich bei Tageslicht in organischen Lösungsmitteln (3.2.4.3.2.).

Daher wurde der Chloroformextrakt sofort wieder mit verdünnter Ameisensäure ausgezogen. Bei der anschließenden Chromatographie der wässrigen Phase an Bio-Gel konnten zwar noch Verunreinigungen von der biologischen Aktivität abgetrennt werden, sie führte jedoch nicht zu einem chromatographisch einheitlichen Produkt.
Die Reinigung wurde an dieser Stelle abgebrochen, um Substanz 1306 II zunächst auf dieser Anreicherungsstufe zu charakterisieren. Danach sollte entschieden werden, ob sich eine weitere Bearbeitung lohnt.

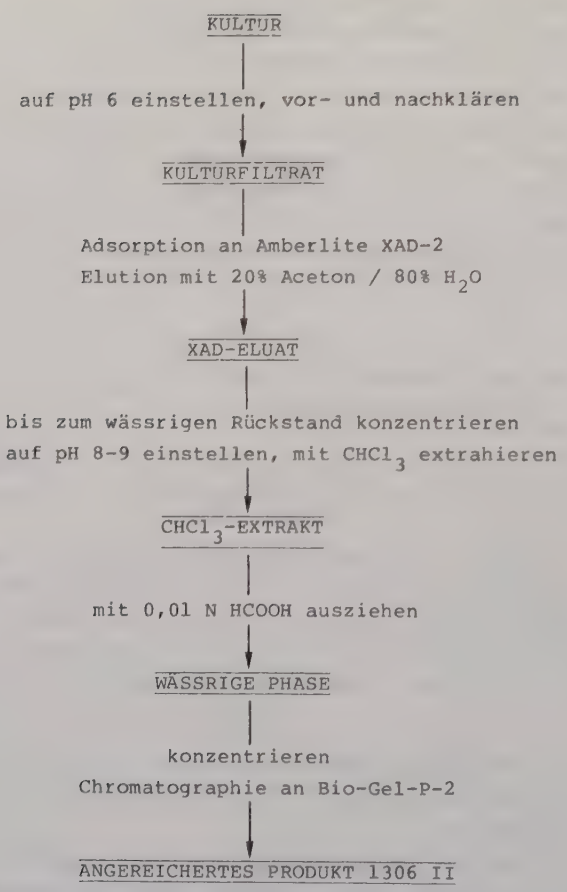



Abb. 13: Aufarbeitungsschema für Substanz 1306 II

### 3.2.4.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung von Substanz 1306 II

#### 3.2.4.3.1. Löslichkeit

Das Antibiotikum 1306 II ist gut löslich in Methanol, Äthanol, Äthylacetat, Chloroform und in verdünnten Säuren. Unlöslich ist es in Wasser und Petroläther.

#### 3.2.4.3.2. Stabilität

In alkalischem Milieu verliert Substanz 1306 II sehr schnell ihre antibiotische Aktivität. Außerdem ist sie in organischen Lösungsmitteln bei Tageslicht äußerst instabil. Zunächst gelb gefärbte Lösungen verfärben sich nach kurzer Zeit bräunlich, dünnschichtchromatographisch lassen sich mehrere zusätzliche inaktive Banden nachweisen.
In Abbildung 14 ist die Abnahme der biologischen Aktivität bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen dargestellt. Abbildung 15 zeigt den Aktivitätsverlust einer Chloroformlösung unter dem Einfluß von Tageslicht. In einer Kontrollösung, die im Dunkeln aufbewahrt wurde, konnte keine Abnahme der antibiotischen Aktivität festgestellt werden.

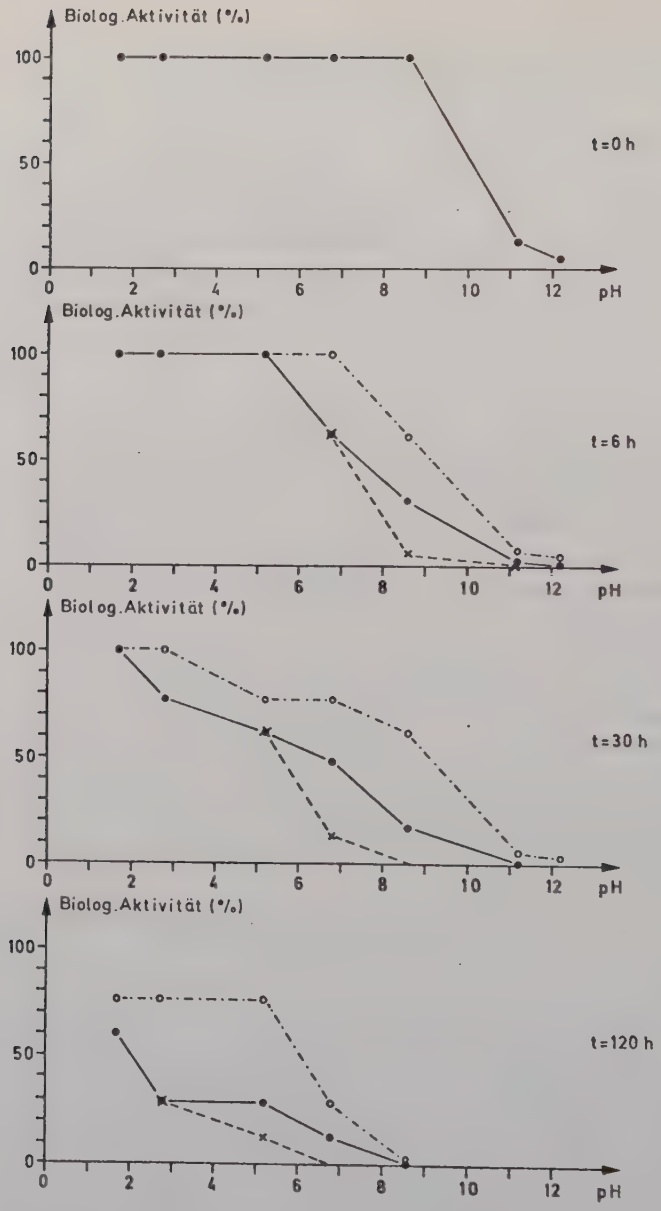



Abb. 14: pH-Empfindlichkeit von Substanz 1306 II

bei 4°C

Zimmertemperatur

37°C

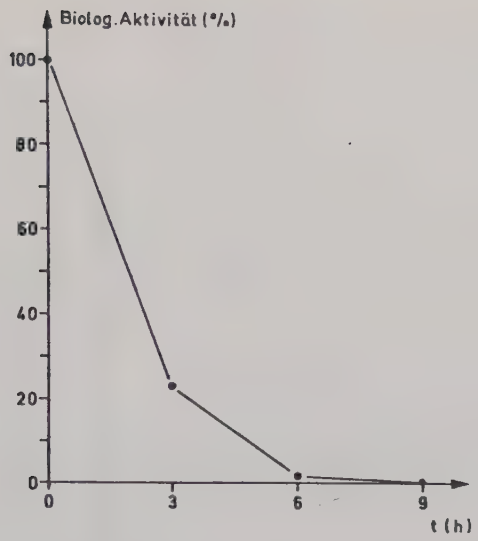



Abb. 15: Lichtempfindlichkeit von Substanz 1306 II in organischen Lösungsmitteln (Chloroformextrakt)

3.2.4.3.3. Dünnschichtchromatographie

In Tabelle 9 sind die $R_f$-Werte von Substanz 1306 II in verschiedenen Laufmittelsystemen zusammengestellt. Die Detektion ist mit Hilfe der Bioautographie (Testorganismus Bacillus subtilis) und aufgrund der gelb-orangen Eigenfärbung der Substanz möglich.
In Laufmittelsystem 1 und 2 spaltet die Aktivität auf. Die Zahlen in Klammern zeigen die $R_f$-Werte, die im Bioautogramm einen wesentlich kleineren Hemmhof aufweisen. Da die Substanz in verdünnter Ameisensäure gelöst war, sind die niedrigeren $R_f$-Werte wahrscheinlich auf das Formiat von 1306 II zurückzuführen.

Tab. 9: $R_f$-Werte von Substanz 1306 II in verschiedenen Laufmittelsystemen

| Laufmittelsystem | $R_f$-Werte | |
|---|---|---|
| 1) Chloroform-Methanol (9:1) | 0,03 | (0,88) |
| 2) Chloroform-Triäthylamin (8:2) | 0,82 | (0,02) |
| 3) Benzol-Methanol-25% $NH_3$ (70:30:3) | 0,56 | |

3.2.4.3.4. Indikatoreigenschaften

Substanz 1306 II besitzt Indikatoreigenschaften. Sie ist in sauren Lösungen gelb, in alkalischen violett.

3.2.4.3.5. Sichtbares- und UV-Spektrum

Zur Aufnahme des Spektrums wurde das Bio-Gel-Eluat in Chloroform-Triäthylamin (s.o.) chromatographiert, die gelbe Bande ($R_f$-Wert 0,82) ausgekratzt und mit Methanol vom Kieselgel eluiert. Abbildung 16 zeigt das Spektrum der Substanz in Methanol und in 0,01 N NaOH bzw. 0,01 N HCl in Methanol.
Die Farbveränderung der Substanz in alkalischem Milieu wird im Spektrum durch die Verschiebung der breiten Bande von 450 nm auf 550 nm sichtbar.

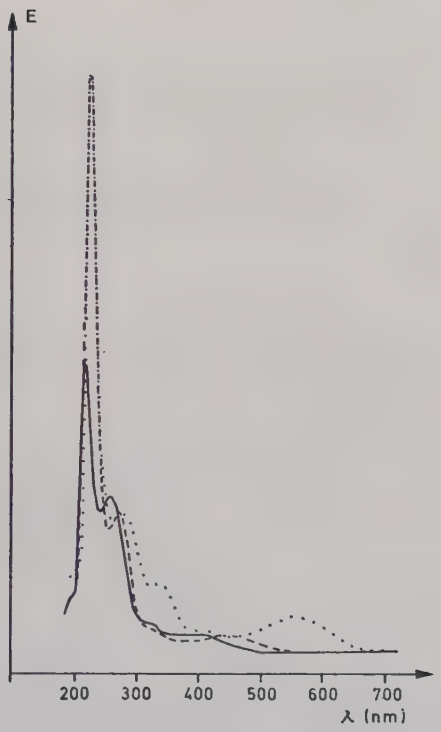



Abb. 16: Sichtbares und UV-Spektrum von Substanz 1306 II in

----- Methanol

——— 0,01 N HCl in Methanol

····· 0,01 N NaOH in Methanol

3.2.4.4. Biologische Charakterisierung

3.2.4.4.1. Wirkungsspektrum

Verschiedene Mikroorganismen wurden im Plattendiffusionstest auf komplexen Medien auf ihre Empfindlichkeit gegen Substanz 1306 II getestet (2.6.3.).
Tabelle 10 zeigt, daß alle getesteten Prokaryonten empfindlich sind. Von den drei ins Spektrum aufgenommenen Eukaryonten wird nur der Oomycet Saprolegnia asterophora gehemmt.

Tab. 10: Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegen Substanz 1306 II

| | Temp. (°C) | Medium | Hemmhofdurchmesser (mm) bei verschiedenen Einheiten (2.6.3.) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 75 | 7,5 | 0,75 | 0,075 |
| Eubacteriales, grampositiv | | | | | | |
| Bacillus brevis | 37 | NB | 24 | 18 | 14 | 10 |
| Bacillus subtilis | 37 | NB | 19 | 14 | 10 | - |
| Corynebacterium rathayi | 27 | NB | 30 | 21 | 13 | Sp |
| Clostridium pasteurianum | 30 | CM | 21 | 16 | 12 | Sp |
| Staphylococcus aureus | 37 | NB | 20 | 16 | 12 | Sp |

Fortsetzung Tab. 10:

| | Temp. (°C) | Medium | Hemmhofdurchmesser (mm) bei verschiedenen Einheiten (2.6.3.) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 75 | 7,5 | 0,75 | 0,075 |
| Eubacteriales, gramnegativ | | | | | | |
| Achromobacter geminiani | 27 | NB | 18 | 12 | - | - |
| Agrobacterium tumefaciens | 27 | NB | 13 | - | - | - |
| E. coli W945 | 37 | NB | 16 | 12 | - | - |
| E. coli W1485 | 37 | NB | 16 | 12 | - | - |
| Proteus vulgaris | 37 | NB | 18 | 14 | Sp | - |
| Salmonella typhimurium | 37 | NB | 16 | 11 | - | - |
| Pseudomonadales | | | | | | |
| Pseudomonas fluorescens | 27 | NB | 21 | 12 | - | - |
| Actinomycetales | | | | | | |
| Streptomyces viridochromogenes | 37 | HA | 33 | 23 | 12 | - |
| Pilze | | | | | | |
| Saprolegnia asterophora | 37 | CMA | 25 | 20 | 15 | (10) |
| Mucor hiemalis (+/-) | Zt | HA | - | - | - | - |
| Saccharomyces cerevisiae | 27 | MA | - | - | - | - |

3.2.4.4.2. Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration im Biophotometer

Um den Einfluß der Substanz 1306 II auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese testen zu können, mußten zuerst die für Einbauversuche günstigen Konzentrationen im Biophotometer ermittelt werden.
Ausgangsmaterial war dieselbe Lösung, die für die Aufnahme des Wirkungsspektrums benutzt wurde. 100 µl dieser Lösung auf 7,5 ml Medium wurden als Einheit 1 definiert. In Abbildung 17 ist die Wirkung auf Bacillus subtilis, in Abbildung 18 auf Escherichia coli dargestellt. Für beide Organismen beträgt die ermittelte minimale Hemmkonzentration 0,3 Einheiten. Bei einer Konzentration von 0,15, die das Wachstum beider Testorganismen eher verzögert als hemmt, bilden sich bei Escherichia coli lange, filamentöse Zellen, ein Effekt, der unter anderem auch unter dem Einfluß von Mitomycin C auftritt (Suzuki et al., 1967).

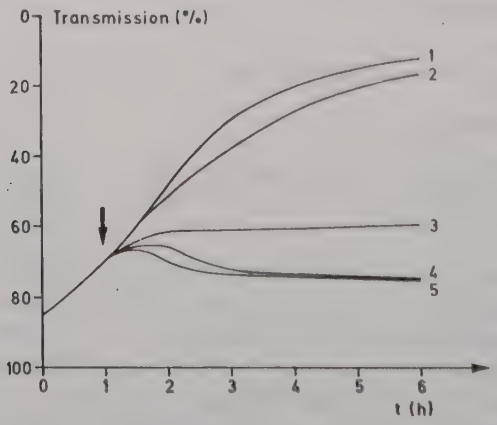



Abb. 17: Einfluß von Substanz 1306 II auf das Wachstum von Bacillus subtilis. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an.

1) Kontrolle
2) Konzentration 0,15 Eh
3) Konzentration 0,3 Eh
4) Konzentration 0,5 Eh
5) Konzentration 1 Eh

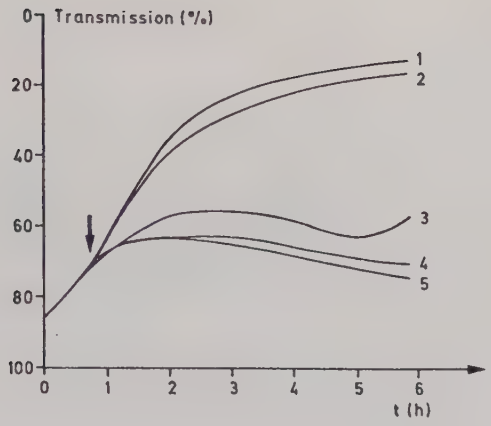



Abb. 18: Einfluß von Substanz 1306 II auf das Wachstum von Escherichia coli. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikumzugabe an.

1) Kontrolle
2) Konzentration 0,15 Eh
3) Konzentration 0,3 Eh
4) Konzentration 0,5 Eh
5) Konzentration 1 Eh

3.2.4.4.3. Einfluß von 1306 II auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese

Der Einfluß von Substanz 1306 II auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo wurde durch den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in säurefällbares Material gemessen. Wie die Abbildungen 19 - 21 zeigen, hemmt 1306 II mit einer Einheit zwischen 0,3 und 1 bei Bacillus subtilis alle drei Makromolekülsynthesen, wobei die DNS-Synthese am stärksten betroffen ist. Nach 20-minütiger Einwirkungszeit einer Konzentration von 1,0 Eh auf Bacillus subtilis wurden die einzelnen Synthesen wie folgt gehemmt:

| | |
|---|---|
| DNS-Synthese | 100 % |
| RNS-Synthese | 66 % |
| Proteinsynthese | 76 % |

Bei Escherichia coli tritt die Wirkung von Substanz 1306 II auf die Proteinsynthese erst mit einer Verzögerung von 5 Minuten nach Zugabe ein. Für eine Hemmung ist außerdem eine Konzentration von 0,3 Eh nicht mehr ausreichend (Abb. 22). Dies ist ein weiterer Hinweis, daß primär die DNS-Synthese betroffen ist und die Hemmung der Proteinsynthese einen Sekundäreffekt darstellt.

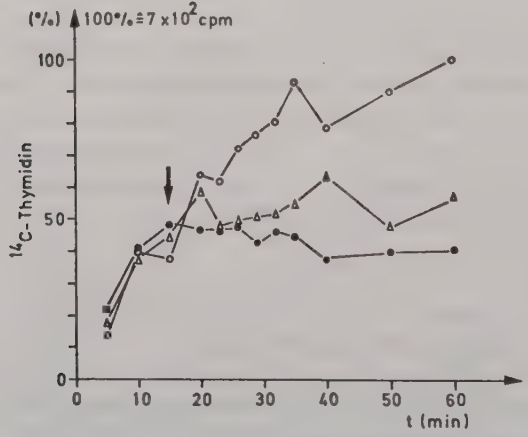



Abb. 19: Einfluß von Substanz 1306 II auf die DNS-Synthese von Bacillus subtilis. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an.

o——o Kontrolle
Δ——Δ Konzentration 0,3 Eh
●——● Konzentration 1 Eh

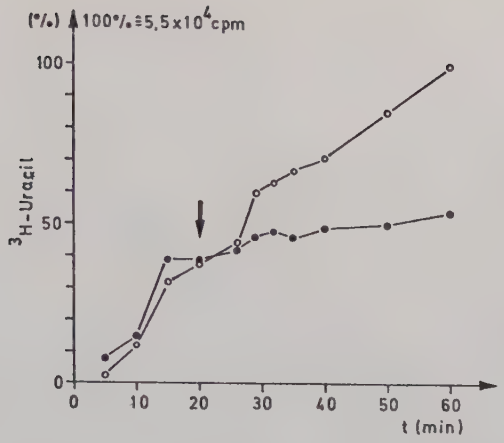



Abb. 20: Einfluß von Substanz 1306 II auf die RNS-Synthese von Bacillus subtilis. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an.

o——o Kontrolle
●——● Konzentration 1 Eh

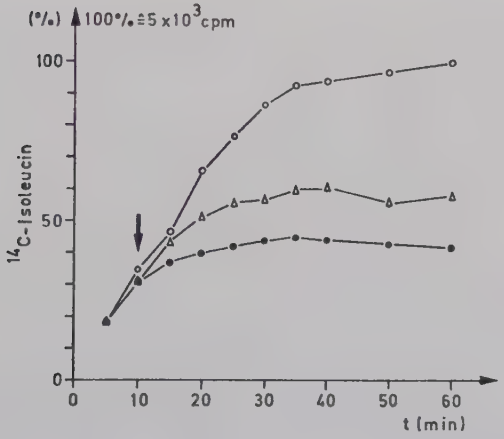



Abb. 21: Einfluß von Substanz 1306 II auf die Proteinsynthese von Bacillus subtilis. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an.

o——o Kontrolle
Δ——Δ Konzentration 0,3 Eh
●——● Konzentration 1 Eh

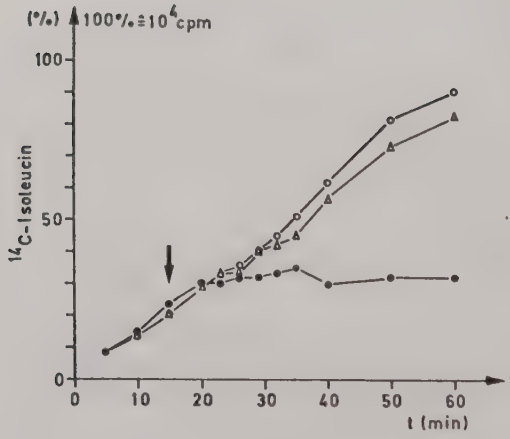



Abb. 22: Einfluß von Substanz 1306 II auf die Proteinsynthese von Escherichia coli. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Antibiotikazugabe an.

o——o Kontrolle
Δ——Δ Konzentration 0,3 Eh
●——● Konzentration 1 Eh

# 4. D I S K U S S I O N

## 4.1. SCREENINGMODELLE

Bei der Suche nach neuen Antibiotika wurde in einem Screening der besonders empfindliche Testorganismus Streptomyces viridochromogenes Tü 57 eingesetzt. Wie die unter 1.1. erwähnten Beispiele Kirromycin und Stenothricin zeigen, können mit diesem Teststamm neue Substanzen gefunden werden. Aus diesem Screening wurde jedoch auch der Streptomycetenstamm Tü 1374 ausgewählt, der das erstmals von Leach et al. (1953) beschriebene Chartreusin bildet. Das zeigt, daß das Screening neben der Möglichkeit, neue Substanzen aufzufinden, auch die Gefahr in sich birgt, Stämme zu bearbeiten, die bekannte Antibiotika in nur geringer Konzentration produzieren. Hierbei stellt sich dann oftmals das Problem der Anreicherung und somit auch der Identifizierung der in Arbeit genommenen Substanz. Dieser Aspekt trifft für alle Screeningmodelle zu, die auf besonders empfindlichen Nachweismethoden beruhen.
Selbstverständlich kann auch mit anderen neuen Screeningmethoden das Auffinden bekannter Antibiotika nicht völlig ausgeschlossen werden. So entwickelte Fleck (1968) ein Screeningmodell für die Suche nach potentiellen Carcinostatika und Virostatika. Mit diesem Screnning wurde eine Substanz isoliert, die zunächst wegen ihrer Hemmwirkung auf die Vermehrung temperenter Lambda-Phagen in Wirtszellen von Escherichia coli Lambdamycin genannt wurde (Fleck et al., 1976). Die Ergebnisse der chemisch-physikalischen Charakterisierung dieses Antibiotikums ergaben jedoch, daß auch Lambdamycin mit Chartreusin identisch ist (Strauss und Fleck, 1977).
Neben der antibakteriellen Wirksamkeit konnte Fleck bei Lambdamycin auch cancerostatische Eigenschaften

nachweisen. Hinzu kommt eine gute nutritive Wirkung bei männlichen Mäusen (Fleck et al., 1976). Während eine nutritive Wirkung von Chartreusin bereits bekannt war, führte die Antitumoraktivität, die inzwischen auch von McGovern et al. (1977) beschrieben wurde, zu neuem Interesse an Chartreusin (Hanka and Gerpheide, 1977).

Das Screeningmodell auf nutritiv wirksame Substanzen (1.2.) wurde von Santo (1976) mit einer größeren Anzahl bekannter Antibiotika geprüft. Dabei zeigte sich, daß speziell der Teststamm Clostridium pasteurianum auf Antibiotika sehr gut anspricht, die nutritiv wirksam sind wie Penicillin, Tetracycline, Bacitracin und Kirromycin (=Delvomycin bzw. Mocimycin). Das heißt natürlich auch, daß Produzenten dieser Antibiotika in diesem Screening positiv auffallen. Mit den bisherigen Erfahrungen wird dies bestätigt, denn unter den bearbeiteten Stämmen befand sich ein Kirromycin- (Thein, 1974), ein Oxytetracyclin- (Botzenhart, 1974) und ein Chlortetracyclinproduzent (Dorgerloh, 1977). Daher ist eine Voraussetzung für die erfolgreichere Weiterführung dieses Screenings, daß diese Antibiotika möglichst schnell erkannt werden können. Sinnvoll erscheint es hier, im Screening resistente Organismen mitzutesten.
Ein erneutes Auffinden von relativ wenig bekannten Antibiotika, wie es beispielsweise die Tirandamycine sind, kann hiermit natürlich nicht verhindert werden. Für solche Substanzen könnte aber bei guter nutritiver Wirkung ein neuer Anwendungsbereich erschlossen werden.
Der Test auf nutritive Wirkung der Tirandamycine mit Küken fiel negativ aus (Hagenmaier et al., 1976). Das kann bedeuten, daß beim nutritiven Effekt neben der Hemmung von Stämmen der Gattung Clostridium doch weitere Faktoren eine wesentliche Rolle spielen. Es ist jedoch auch denkbar, daß eine Veränderung der Tirandamycine im Magen-Darm-Trakt der Tiere zum Verlust der antibakteriellen Wirksamkeit führt.

Eine endgültige Bewertung dieses Screenings ist aufgrund der geringen Zahl der bearbeiteten Stämme bzw. Substanzen noch nicht möglich. Das Beispiel der Tirandamycine zeigt jedoch, daß die erwünschte Korrelation zwischen erstem Test und späterer Wirkung am Tier (1.2.) nicht unbedingt gegeben ist.

## 4.2. ZUR WIRKUNGSWEISE DER TIRANDAMYCINE

Ein Eingriff in die RNS-Synthese ist an allen vier an der Reaktion beteiligten Komponenten möglich. Substanzen, die zu einer Hemmung der RNS-Synthese führen, können demnach in vier Gruppen unterteilt werden (Abb. 23).

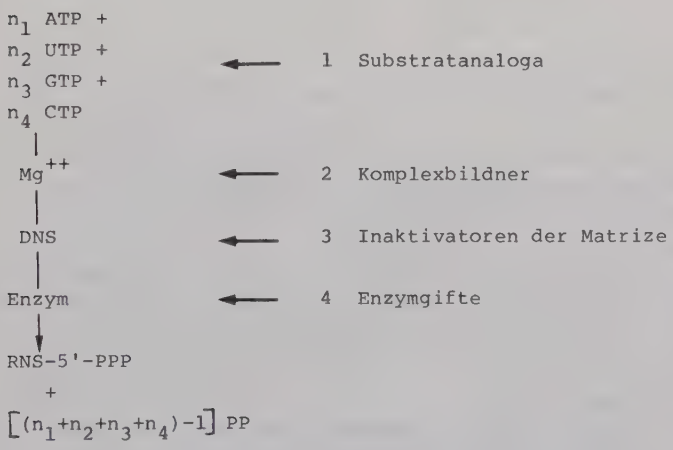



Abb. 23: Substanzgruppen, die zu einer Hemmung der RNS-Synthese führen (nach Lill et al., 1969)

Während in vivo Substratanaloga auch andere nucleotidabhängige Reaktionen beeinflussen (Lill et al., 1969), Komplexbildner die entsprechenden metallionenabhängigen

Prozesse stören (z.B. Lomofungin, Fraser and Creanor, 1975; Ethericin A, Schanz 1978) und Inaktivatoren der Matrize auch zu einer Hemmung der DNS-Synthese führen (Hartmann et al., 1968), wird von den spezifisch auf das Enzym wirkenden Substanzen ausschließlich die RNS-Synthese gehemmt.
Der Einfluß der Tirandamycine auf die Makromolekülsynthesen in vivo (Santo, 1976) und die Versuche zur Hemmung der RNS-Synthese in vitro (Santo, 1976; Reusser, 1976) legen nahe, diese Antibiotika in Gruppe vier einzuordnen. In diese Gruppe gehören die Rifamycine, Streptovaricine und Tolpomycin (= Ansamycine) und die Streptolydigine.

Bevor die Wirkung dieser Antibiotika auf die RNS-Polymerase näher diskutiert wird, soll zunächst das Enzym und der Ablauf der RNS-Synthese beschrieben werden.

### 4.2.1. DNS-abhängige RNS-Polymerase und RNS-Synthese

Die DNS-abhängige RNS-Polymerase ist wahrscheinlich für die gesamte, zumindest aber für den größten Teil der Transkription in der Bakterienzelle verantwortlich (Chamberlin, 1976). Das Enzym besteht aus zwei großen Untereinheiten ß und ß' (MG ca. 160000), zwei kleineren identischen oder nahezu identischen $\alpha$-Untereinheiten (MG ca. 40000) und dem Initiationsfaktor $\delta$ (MG je nach Herkunft zwischen 44000 und 92000) (Zillig et al., 1976; Burgess, 1976).
Diese komplexe Struktur des Enzyms entspricht dem komplexen Vorgang der Transkription, der eine Vielfalt von Kontrollmechanismen einschließt. Formal wird die Transkription in folgende Schritte eingeteilt (Chamberlin, 1976):

1) Bindung des Enzyms an die DNS
   Bei diesem ersten Schritt der Transkription tritt das Holoenzym ($\alpha_2\beta\beta'\delta$) an einer für die Initiation günstigen Stelle in Wechselwirkung mit der DNS.

2) Initiation
   Das Enzym katalysiert unter Abspaltung von Pyrophosphat die Bindung von ATP oder GTP an ein zweites Ribonucleosidtriphosphat.

3) Elongation
   Ribonucleotide werden schrittweise an die 3'-OH-Gruppe des Dinucleosidtetraphosphat des Initiationsschrittes angeknüpft.

4) Termination
   Dissoziation des Komplexes aus DNS, neu synthetisierter RNS und Enzym.

Für die Durchführung dieser Schritte werden vier verschiedene Bereiche auf dem Enzym gefordert (Krakow et al., 1976):

1) Eine DNS-Bindungsstelle,
   die durch Wechselwirkung mit beiden Strängen der DNS die lokale Auflösung der helicalen Struktur erleichtert.

2) Eine 3'-OH-Bindungsstelle (Initiationsseite),
   die an der richtigen Anordnung des initiierenden Purintriphosphats beteiligt ist. Diese Stelle dient möglicherweise während der Elongation als Produkt-Seite.

3) Eine Elongations-Nucleotid-Stelle (Substratseite),
   an der die Nucleosidtriphosphate als Magnesium- oder Mangan-Komplexe gebunden werden.

4) Eine Produkt-Seite,
   an der ein Teil der wachsenden RNS mit dem Komplex aus Enzym und DNS bis zur Termination verbunden bleibt.

Es bleibt zu fragen, auf welchen der Untereinheiten diese geforderten Bereiche liegen.
Nach Zillig et al. (1976) ist die ß'-Untereinheit sowohl an der Bindung des Enzyms an die DNS als auch an der Interaktion des Core-Enzyms ($\alpha_2$ßß') mit dem Sigma-Faktor beteiligt. Die ß-Untereinheit hat Anteil an der Bindung der Substrate, wahrscheinlich über die Initiations- und die Substratseite. Sie trägt Bindungsstellen für die α-Untereinheit und die Antibiotika Streptolydigin und Rifampicin. Wahrscheinlich wirkt sie auch an der Translokation mit. Die Untereinheit α, die eine Bindungsstelle für ß trägt, ist an der Gen-Expression beteiligt.

### 4.2.2. Wirkung von Rifampicin, Streptolydigin und Tirandamycin auf die RNS-Polymerase

Die Rifamycine gehören ihrer Struktur nach zu den Ansamycinen, die Streptolydigine und Tirandamycine zu den Tetramsäureantibiotika. Dennoch weisen diese Substanzen gewisse Strukturanalogien auf (Abb. 24), die nach Wehrli (1977) für die ähnliche biologische Wirkung verantwortlich sein könnten.

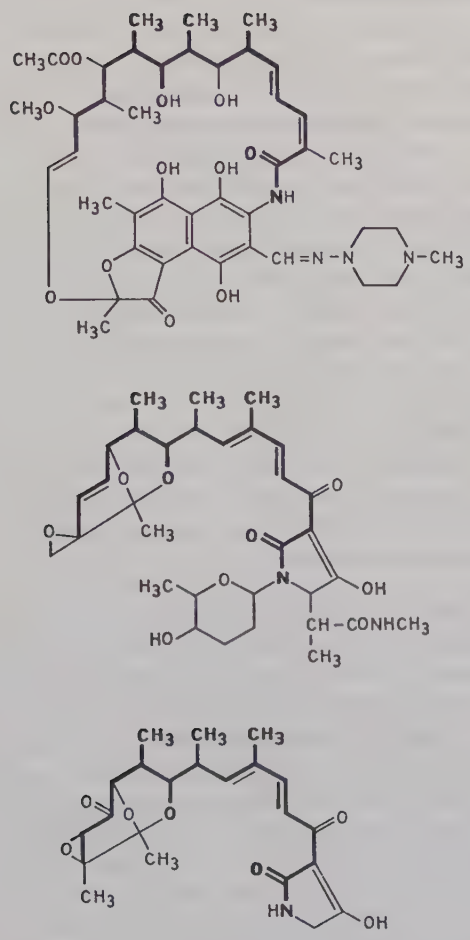



Abb. 24: Strukturanalogien von Rifampicin, Streptolydigin und Tirandamycin A (nach Wehrli, 1977)

Gemeinsam ist diesen Antibiotika die spezifische Wirkung auf die DNS-abhängige RNS-Polymerase von Prokaryonten.
Für Rifampicin und Streptolydigin ist nachgewiesen, daß wirkortresistente Escherichia coli-Stämme eine veränderte ß-Unterienheit aufweisen (Schleif, 1969; Rabussay and Zillig, 1969; Heil and Zillig, 1970), was für eine Bindung dieser Antibiotika an diese Untereinheit spricht. Durch genetische Analysen konnte gezeigt werden, daß alle Mutationsstellen, die die Sensitivität der Polymerase gegenüber Streptolydigin und Rifampicin beeinflussen, eng beisammen auf einem kurzen Segment des Cistrons liegen, das die Struktur der ß-Kette determiniert (Iwakura et al., 1973; Sonenshein et al., 1974).
Für Tirandamycin ist eine Bindung an die ß-Unterheinheit nicht bewiesen. Das Antibiotikum zeigt jedoch Kreuzresistenz mit Streptolydigin (Reusser, 1976), was als Hinweis für die Bindung auch dieser Substanz an die ß-Untereinheit angesehen werden kann.

Die Wirkung von Rifampicin und Streptolydigin auf die RNS-Polymerase zeigt deutliche Unterschiede. Während Streptolydigin unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe zu einer Hemmung der Synthese führt (Siddhikol et al., 1969) (Hemmung der Initiation und Elongation), wird von Rifampicin die Elongation nicht beeinflußt. Dies wird darauf zurückgeführt, daß Rifampicin an einen RNS-Polymerase-DNS-Komplex nur 500mal langsamer binden kann als an das freie Enzym (Wehrli, 1977). Die Wirkung von Rifampicin wird heute so verstanden, daß das Antibiotikum im Verhältnis 1:1 an das Enzym bindet und dadurch sterisch die Translokation des initiierenden Dinucleosidtetraphosphats an die Produktseite verhindert (Yarbrough et al., 1976; Wehrli, 1977).

Die Hemmung der RNS-Polymerase durch Streptolydigin wird nach Cassani et al. (1971) dadurch bewirkt, daß das Antibiotikum zu einer stärkeren Bindung innerhalb des Enzym-DNS-Komplexes führt, wodurch die Fähigkeit des Enzyms, Phosphodiesterbindungen zu knüpfen, herabgesetzt wird. Ferner stellten sie fest, daß unter dem Einfluß von Streptolydigin die Affinität von UTP an die Polymerase ab-, die von CTP dagegen zunimmt.
Von der Helm and Krakow (1972) fanden ebenfalls eine Stabilisierung des DNS-Enzymkomplexes durch Streptolydigin, und zwar in einer ähnlichen Weise wie sie durch ATP bewirkt wird. Sie führen die Wirkung von Streptolydigin auf eine Bindung des Antibiotikums nahe der 3'-OH-Bindungsstelle zurück, was zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt. Durch diese Änderung würde die richtige Anordnung der 3'-OH-Gruppe nicht mehr gewährleistet und dadurch die Knüpfung der Diesterbindung erschwert.
Die enge strukturelle Verwandtschaft der Tirandamycine zu Streptolydigin und die Hemmung der Initiation und Elongation durch die Tirandamycine (Santo, 1976; Reusser, 1976) lassen einen dem Streptolydigin ähnlichen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen auf die RNS-Polymerase vermuten.
Die Wirkung von Tirandamycin auf die Kinetik der Polymerisation (Anthony et al., 1969) zeigt, daß durch den Einfluß des Antibiotikums sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Affinität der Substrate an das Enzym herabgesetzt wird (Abb. 25).

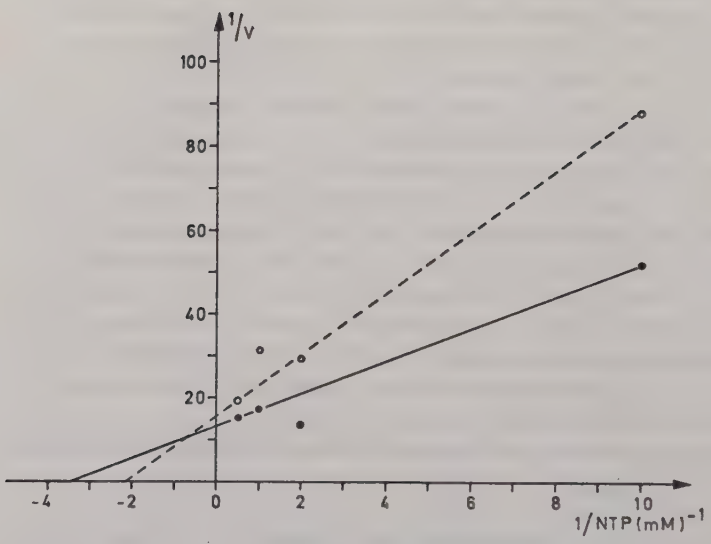



Abb. 25: Einfluß von Tirandamycin B auf die Kinetik der Polymerisation (Lineweaver-Burk-Diagramm)

NTP = Nucleotidkonzentration (mM)
V = cpm x $10^{-3}$ nach 10 min.

——— Kontrolle
----- 125 µg/ml Tirandamycin B

Die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit steht in Einklang mit den Resultaten von Cassani et al. (1970), die feststellten, daß Streptolydigin die Geschwindigkeit des RNS-Kettenwachstums reduziert. Der Einfluß von Tirandamycin B auf die Affinität der Nucleotide kann möglicherweise wie bei Streptolydigin allein auf die schwächere Bindungsfähigkeit von UTP in Gegenwart des Antibiotikums zurückgeführt werden. Dagegen spricht jedoch, daß die Erhöhung der ATP- bzw. UTP-Konzentration von 1 mM auf 2 mM die Hemmwirkung von Tirandamycin B um ca. 50% vermindert (3.2.3.4.3.). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Tirandamycin B für die genannten Nucleotide ein kompetitiver Inhibitor ist.
Nach den heutigen Vorstellungen (Krakow et al., 1976) werden während der Elongation zunächst schwache Komplexe aller Substrate an einer gemeinsamen Stelle des Enzyms gebildet. Für die Katalyse erfolgt dann eine Konformationsänderung in einen stärkeren Komplex. Diese Änderung scheint von der Fähigkeit des Basenteils der Substrate abhängig zu sein, an eine Stelle des Enzyms zu gelangen, die auch die komplementäre Base enthält. Für Streptolydigin und die Tirandamycine könnte dies bedeuten, daß sie zum einen die richtige Anordnung der 3'-OH-Gruppe des Nucleotids an der Initiationsseite verhindern und zum anderen auch diese Konformationsänderung für bestimmte Nucleotide beeinflussen.
Offen ist die Frage, worin die Diskrepanz zwischen den sehr niedrigen Konzentrationen für eine Hemmung der RNS-Synthese bei empfindlichen Testorganismen in vivo (Santo, 1976) im Gegensatz zu den recht hohen Konzentrationen im in vitro-System mit der Polymerase aus Escherichia coli begründet ist. Zur Diskussion stehen hier:

1) Eine Anreicherung der Antibiotika in der Bakterienzelle, wie sie z.B. bei Tetracyclin nachgewiesen werden konnte (Franklin and Higginson, 1970).
2) Die Modifikation der Antibiotika in der Zelle zu aktiveren Verbindungen.
3) Eine höhere Sensitivität der RNS-Polymerase empfindlicher Mikroorganismen.

Hier soll nur auf Punkt 3) näher eingegangen werden. Fukuda et al. (1977) testeten die Empfindlichkeit von RNS-Polymerasen aus verschiedenen Bakterien gegenüber einem Anti-Serum gegen die ß- und ß'-Untereinheit der Escherichia coli-Polymerase. Dabei zeigte sich, daß von dem Anti-ß-Serum die Enzymaktivität aller getesteten Bakterien gehemmt wird, während sich mit dem Anti-ß'-Serum beträchtliche Unterschiede ergaben. Die Autoren ziehen daraus den Schluß, daß die Proteinstruktur der RNS-Polymerase in der Nähe des katalytischen Zentrums (ß-Untereinheit) nur wenige Variationsmöglichkeiten zuläßt.
Andererseits konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß Resistenz gegen Rifampicin auf dem Austausch nur einer Aminosäure in der ß-Untereinheit der Escherichia coli-Polymerase beruhen kann (Rabussay and Zillig, 1969). Daraus könnte man nun schließen, daß auch umkehrt eine geringfügig veränderte Aminosäuresequenz der ß-Untereinheit bei Streptolydigin- und Tirandamycin-sensitiven Stämmen eine erhöhte Empfindlichkeit der Polymerase zur Folge haben könnte.
Daß es Unterschiede in der Empfindlichkeit bei verschiedenen RNS-Polymerasen gibt, konnten Date et al. (1975) zeigen. Sie isolierten die RNS-Polymerase aus dem extrem thermophilen Stamm Thermus thermophilus HB 8 und testeten die Sensititvität gegen Streptolydigin und Rifampicin. Im Gegensatz zur Polymerase aus Escherichia coli ist dieses Enzym weitaus empfindlicher gegen Streptolydigin als gegen Rifampicin.

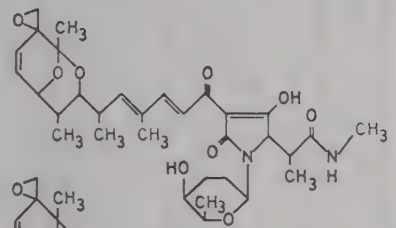
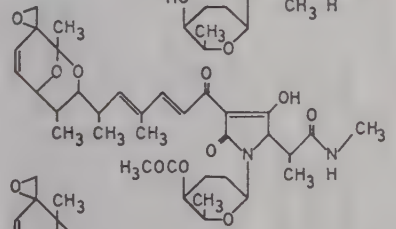
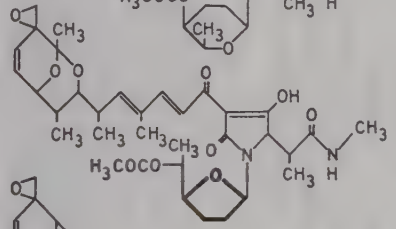
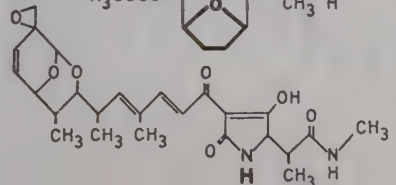
### 4.2.3. Vergleich der Hemmwirkung von Tirandamycin A und B mit anderen Antibiotika, die Tetramsäure als Strukturelement enthalten

Tirandamycin A und B sind mit Streptolydigin (Rinehart et al., 1963) strukturell eng verwandt (4.2.2.). Diese Tatsache zeigt sich in einem sehr ähnlichen Wirkungsspektrum und in der Hemmung der RNS-Polymerasereaktion, wobei jedoch für die Hemmung in vitro verglichen mit Streptolydigin (Siddhikol et al., 1969; Cassani et al., 1971) höhere Tirandamycinkonzentrationen benötigt werden. Hierbei stellte sich die Frage, welche der strukturellen Unterschiede für die schwächere Wirkung der Tirandamycine verantwortlich sind.
Die Isolierung natürlich vorkommender Streptolydiginderivate durch Frobel (1977) ermöglichte einen genaueren Vergleich dieser Substanzgruppe. Als Kriterien für eine Struktur-Wirkung-Beziehung wurden die minimalen Hemmkonzentrationen bei verschiedenen Testorganismen und der Einfluß der Substanzen auf die RNS-Polymerasereaktion in vitro verwendet.
In den Vergleich wurden neben den Streptolydiginen noch α- und ß-Lipomycin (Schabacher und Zeeck, 1973) und Oleficin (Horváth et al., 1973) einbezogen, die wie die Tirandamycine und Streptolydigine Tetramsäure als Strukturelement enthalten.
Die Ergebnisse und die Strukturen der Antibiotika sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

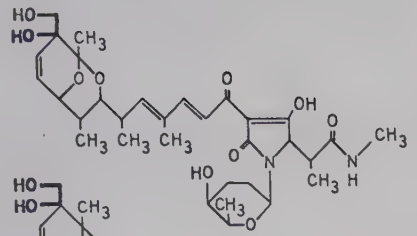
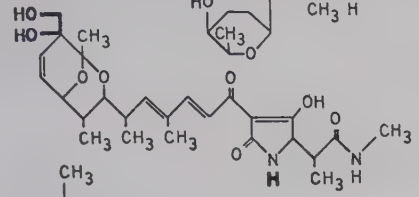
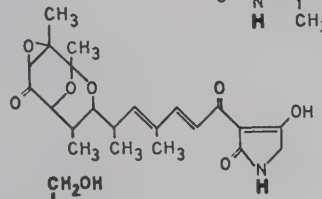
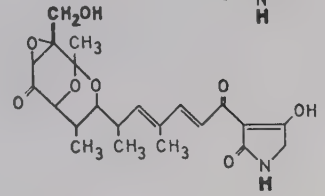
---

Die Ergebnisse für die Streptolydigine wurden von Frau Dr. H. Drautz, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen, ermittelt.

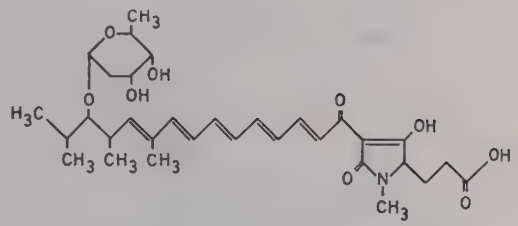
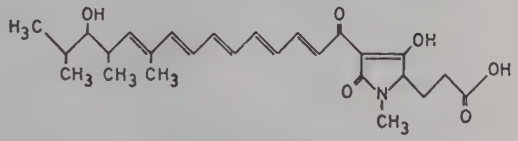
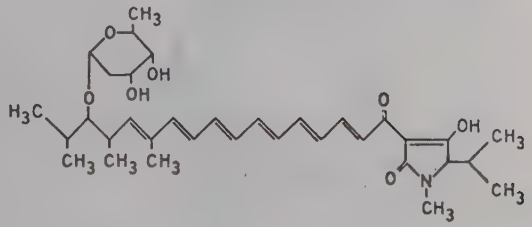
Tab. 11: Struktur-Wirkungsbeziehung bei verschiedenen Antibiotika, die Tetramsäure als Strukturelement enthalten

| Struktur | Bezeichnung | Polymerase[1)] | MHK (µg/ml) Cl. past. | B. subt. | B. brev. |
|---|---|---|---|---|---|
|  | Streptolydigin | 16,5 | 0,3 | 30 | 3 |
|  | Strepto-lydigin-monoacetat[2)] | 18 | 0,3 | 30 | 10 |
|  | Strepto-lydigin-furanosid-monacetat[3)] | 52 | 0,3 | 100 | 10 |
|  | Desrhodinyl-Streptolydigin | 65 | 1 | 100 | 10 |

Fortsetzung Tab. 11:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
|  | Strepto-lydigin-Glykol | > 100 | 10 | 100 | 100 |
|  | Desrhodinyl-Strepto-lydigin-Glykol | > 100 | 100 | 100 | 100 |
|  | Tiranda-mycin A | 62,5 | 0,1 | 10 | 3 |
|  | Tiranda-mycin B | 125 | 0,3 | 30 | 1 |

Fortsetzung Tab. 11:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
|  | α-Lipomycin | 55 | 1 | 10 | 100 |
|  | ß-Lipomycin | 85 | 10 | 100 | 100 |
|  | Oleficin[4] | 100 | 1 | 30 | 100 |

Anmerkungen zu Tab. 11:

1) Die Zahlen geben die Konzentration in µg/ml an, die für eine 50%ige Hemmung der Polymeraserektion erforderlich sind.
2), 3) Streptolydiginmonoacetat und Streptolydigin-furanosid-monoacetat sind keine natürlich vorkommenden Derivate (Frobel, 1977).
4) Die Strukturformel von Oleficin wurde verändert nach Zeeck (1977)

Aus der Tabelle wird deutlich:

1) Innerhalb der Gruppe der Streptolydigine und Tirandamycine sind drei Strukturelemente für die Hemmung der Polymerasereaktion in vitro von Bedeutung:
   a) Zucker am Stickstoff des Heterocyclus.
   b) Konfiguration des Zuckers (Da Streptolydiginfuranosid nur als Monoacetat stabil ist, mußte mit Streptolydiginpyranosidmonoacetat verglichen werden.)
   c) Bicyclus. Sowohl eine Öffnung des Epoxids wie bei Streptolydigin-Glykol und Desrhodinyl-Streptolydigin-Glykol als auch der Austausch der Methylgruppe an $C_{22}$ durch eine Hydroxymethylgruppe bei Tirandamycin B vermindern die Hemmwirkung.
2) Bei den Streptolydiginen besteht eine enge Korrelation zwischen der Hemmung der Polymerasereaktion in vitro und den minimalen Hemmkonzentrationen der getesteten Mikroorganismen.
3) Tirandamycin A bewirkt zwar erwartungsgemäß durch das Fehlen des Zuckers am Heterocyclus nahezu die gleiche Hemmung der Polymerasereaktion wie Desrhodinylstreptolydigin, weist aber niedrigere minimale Hemmkonzentrationen auf.
4) Den Lipomycinen und Oleficin fehlen die Strukturelemente, die bei den Streptolydiginen für eine gute Wirkung auf die RNS-Polymerase notwendig sind. Dennoch werden für eine 50%ige Hemmung der RNS-Synthese in vitro niedrigere Konzentrationen benötigt als für Streptolydigin-Glykol und Desrhodinylstreptolydigin-Glykol.
   Die bessere Wirkung von α-Lipomycin im Gegensatz zu ß-Lipomycin könnte ein Hinweis sein, daß die Digitoxose eine ähnliche Funktion erfüllt wie der Bicyclus der Streptolydigine und Tirandamycine. Dagegen spricht jedoch die schlechtere Wirkung von Oleficin, das sich von den Lipomycinen aber auch noch durch eine zusätzliche konjugierte Doppelbindung und eine unpolare Seitenkette am Tetramsäureteil unterschiedet.

Naturstoffe, die ein Tetramsäurestrukturelement enthalten, zeigen sehr unterschiedliche biologische Wirkungen. So weist die aus Alternaria-Arten isolierte Tenuazonsäure (Stickings, 1959; Meronuck et al., 1972) keine antibakteriellen Eigenschaften auf, hemmt jedoch die Proteinsynthese eukaryotischer Zellen (Shigeura, 1967). Bei den Lipomycinen wird als primäre Wirkung ein Eingriff in die Cytoplasmamembran angenommen (Kunze, 1975), für Oleficin die Hemmung der Zellwandsynthese (Nagy and Horváth, 1973). Die Streptolydigine und Tirandamycine schließlich gelten als Hemmstoffe der bakteriellen RNS-Polymerase. Hieraus wird deutlich, daß der Tetramsäureteil dieser Substanzen wohl nicht als Wirkgruppe angesehen werden kann. Viel eher ist denkbar, daß dieser Strukturteil für den Transport dieser Verbindungen in die Zelle verantwortlich ist und die unterschiedliche Wirkung auf den verschiedenen Substituenten am Tetramsäureteil beruht.

Die bessere Wirkung von Tirandamycin A in vivo bei gleicher Wirkung auf die RNS-Synthese in vitro im Vergleich zu Desrhodinylstreptolydigin könnte auch auf den Transport dieser Substanzen zurückgeführt werden. Den Tirandamycinen fehlt die Amidseitenkette an $C_5$ der Streptolydigine. Diese Seitenkette ist offensichtlich bei der Wirkung der Substanzen auf die RNS-Polymerase nicht von Bedeutung (Tab. 11). Aus den vorliegenden Ergenissen könnte man daher schließen, daß ein an $C_5$ nicht substituierter Tetramsäureteil zu einer besseren Aufnahme der Substanzen in die Zelle führt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ein Streptolydiginderivat ohne Amidseitenkette für einen Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen und die Hemmung der RNS-Synthese in vitro zur Verfügung zu haben.

Auffallend in Tabelle 11 ist auch die hohe Empfindlichkeit von Clostridium pasteurianum gegenüber den getesteten Tetramsäureantibiotika. Dies könnte bedeuten, daß dieser Organismus über ein gutes Transportsystem für Tetramsäureverbindungen verfügt. Hiermit könnten dann die Unterschiede, die bei der Hemmung der RNS-Synthese in vivo und in vitro auftreten, ebenso gut erklärt werden wie durch die Annahme, daß dieser Organismus eine empfindlichere RNS-Polymerase aufweist (4.2.2.).

## 4.3. ZUORDNUNG VON SUBSTANZ 1306 II ZU EINER ANTIBIOTIKAGRUPPE

Auf der Basis der unter 3.2.4.3./4. beschriebenen Charakteristika wurde Substanz 1306 II mit bekannten Antibiotka verglichen.
Als erstes Kriterium wurde die Wirkung auf die Makromolekülsynthesen, speziell die Nucleinsäuresynthesen herangezogen. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Substanzen, die bei Gottlieb and Shaw (1967), Goldberg and Friedman (1971), Kersten and Kersten (1974), Corcoran and Hahn (1975) und Cozzarelli (1977) als Hemmstoffe der Nucleinsäuresynthesen beschrieben sind, wurden den Eigenschaften von Substanz 1306 II gegenübergestellt. Danach ist eine Zugehörigkeit von Substanz 1306 II zur Pluramycin-Gruppe (Bérdy, 1974) am wahrscheinlichsten. In Tabelle 12 sind Antibiotika, die zu dieser Gruppe gehören, zusammengestellt. Eine Identität von Substanz 1306 II mit einer dieser Substanzen ließ sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen nicht nachweisen.

Tab. 12: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Antibiotika der Pluramycingruppe

(n.b. = nicht beschrieben)

| | Polarität | Indikator-eigenschaften | Stabilität |
|---|---|---|---|
| 1306 II | lipophil, basisch | gelb in sauren, violett in alkalischen Lösungen | instabil in alkalischem Milieu und in organischen Lösungsmitteln bei Tageslicht |
| Hedamycin | s.o. | s.o. | stabil in Abwesenheit von Luft und Licht, instabil in Lösungen |
| Iyomycin $B_1$ | s.o. | s.o. | stabiler in schwach alkalischem als in saurem Milieu |
| Kidamycin | s.o. | s.o. | n.b. |
| Neopluramycin | s.o. | s.o. | n.b. |
| Pluramycin A | s.o. | s.o. | instabil in wässrigen Lösungen, instabiler in sauren als in schwach alkalischen Lösungen |
| Rubiflavin | s.o. | s.o. | instabil in Wasser und Alkoholen, stabil in wasserfreiem Äthylacetat, Chloroform, Benzol |

| Löslichkeit | UV-Maxima | Literatur |
|---|---|---|
| gut löslich in Methanol, Äthanol, Äthylacetat, Chloroform, verdünnten Säuren; unlöslich in Wasser und Petroläther | 225 273 320sh 450(MeOH)<br>220 260 400(HCl)<br>230 280 330sh 550(NaOH) | |
| s.o. | 245 260-265sh 430(MeOH)<br>254 324 535(NaOH) | Schmitz et al. (1966)<br>Séquin et al. (1977) |
| s.o. | 243 270 430(MeOH) | Sano et al. (1964) |
| s.o. | 244 270sh 434(MeOH) | Kanda (1971)<br>Furukawa (1974) |
| s.o. | 216 243 270 430(EtOH)<br>218 243 272 426(HCl)<br>206 248 260sh 320 546(NaOH) | Kondo et al. (1970) |
| s.o. | 245 265-270sh 430(EtOH)<br>405(HCl)<br>525(NaOH) | Maeda et al. (1956) |
| s.o. | 244 265sh 395sh 428 446sh(EtOH) | Aszalos et al. (1964) |

Von einer weiteren Bearbeitung des Antibiotikums wurde dennoch aus folgenden Gründen abgesehen:

1) Durch die große Labilität der Substanz (z.B. Aktivitätsverlust in einem Chloroformextrakt nach 3 Stunden am Tageslicht 80%) können zahlreiche übliche Reinigungsverfahren nicht angewendet werden.

2) Die meisten Nucleinsäurehemmstoffe bieten aufgrund ihrer Toxizität keine Anwendungsmöglichkeit (Franklin and Snow, 1971). Dies gilt auch für die Antibiotika der Pluramycingruppe. Alle Substanzen dieser Gruppe zeigen zwar gute Antitumoraktivität, eine Eigenschaft, die immer noch von großem Intersse ist, sind aber insgesamt für einen Einsatz zu toxisch.

## 5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus zwei Streptomycetenstämmen, Tü 1374 und Tü 1306, wurden vier Antibiotika isoliert bzw. angereichert und charakterisiert.

Die Substanz aus Tü 1374 konnte nach wenigen Anreicherungsschritten aufgrund ihres charakteristischen UV-Spektrums als Chartreusin identifiziert werden.

Zwei der Antibiotka aus Streptomyces griseoflavus Tü 1306 erwiesen sich als identisch mit Tirandamycin A und B. Da diese Antibiotika nach einer Aufarbeitung im 200 l - Maßstab als Eisenkomplexe vorlagen, wurde die biologische Wirkung der Komplexe mit den metallfreien Verbindungen verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.
Versuche zur Wirkung der Tirandamycine auf die RNS-Synthese in vitro zeigten, daß durch eine Verdopplung der ATP- bzw. UTP-Konzentration die Hemmwirkung um 50% reduziert werden kann.
Die Wirkungsweise der Tirandamycine wurde mit Streptolydigin und weiteren Tetramsäureantibiotika verglichen.

Die dritte Verbindung aus Tü 1306, eine orangegelb gefärbte lipophile Base, konnte wegen ihrer großen Labilität mit den gebräuchlichen Aufarbeitungsverfahren nicht gereinigt werden. Die mit einem angereicherten Produkt durchgeführten Versuche zur biologischen Wirkung ergaben, daß diese Substanz ein Hemmstoff der DNS-Synthese ist. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften lassen eine Zugehörigkeit des Antibiotikums zur Pluramycin-Gruppe vermuten.

## 6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Anthony, D.D., C.W. Wu and D.A. Goldthwait: Studies with the ribonucleic acid polymerase. II. Kinetic aspects of initiation and polymerization. Biochemistry 8, 246 - 256 (1969)

Aszalos, A., M. Jelinek and B. Berk: Rubiflavin, a toxic antitumor antibiotic. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 68 - 74 (1964)

Auden, J., J. Gruner, J. Nüesch and F. Knüsel: Some statistical methods in nutrient medium optimalisation. Path. Microbiol. 30, 858 - 866 (1967)

Beck, W.: Mutanten von Escherichia coli W 945 mit veränderter Antibiotika-Sensitivität. Isolierung und Versuche zur Charakterisierung. Dissertation Universität Tübingen (1975)

Bérdy, J.: Recent developments ob antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Adv. Appl. Microb. 18, 309 - 407 (1974)

Botzenhart, M.: Untersuchungen der Antibiotika des Streptomyceten Tü 441. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie I Universität Tübingen (1974)

Burgess, R.R.: Purification and physical properties of E. coli RNA-polymerase. In: RNA-polymerase, pp. 69 - 100. Eds. R. Losick and M. Chamberlin. Cold Spring Harbor Laboratory (1976)

Cassani, G., R.R. Burgess, H.M. Goodman and L. Gold: Inhibition of RNA-polymerase by streptolydigin. Nature New Biology 230, 197 - 200 (1971)

Chamberlin, M.J.: RNA-polymerase - an overview. In: RNA-polymerase, pp. 17 - 68. Eds. R. Losick and M. Chamberlin. Cold Spring Harbor Laboratory (1976)

Corcoran, J.W. and F.E. Hahn: Antibiotics III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. New-York: Springer-Verlag (1975)

Cozzarelli, N.R.: The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. Ann. Rev. Biochem. 46, 641 - 668 (1977)

Date, T., K. Suzuki and K. Imahori: Purification and some properties of DNA-dependent RNA-polymerase from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB 8. J. Biochem. 78, 845 - 858 (1975)

Davis, B.D. and E.S. Mingioli: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin $B_{12}$. J. Bact. 60, 17 - 28 (1950)

Dorgerloh, M.: Persönliche Mitteilung. Institut für Mikrobiologie I der Universität Tübingen (1977)

Drautz, H.: Lysolipin I, ein neues Antibiotikum aus Streptomyces violaceoniger. Dissertation Universität Tübingen (1975)

Ducluzeau, R., F. Dubos, P. Raibaud and G.D. Abrams: Inhibition of Clostridium perfringens by an antibiotic substance produced by Bacillus licheniformis in digestive tract of gnotobiotic mice: Effect on other bacteria from the digestive tract. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 9, 20 - 25 (1976)

Elliott, R.F.: Uses of antibiotics in animal production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 739 - 746 (1966)

Fleck, W.: Eine neue mikrobiologische Screening-Methode für die Suche nach potentiellen Carcinostatika und Virostatika mit Wirkung im Nucleinsäure-Stoffwechsel. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 8, 139 - 144 (1968)

Fleck, W., D. Strauss, H. Prauser, W. Jungstand, H. Heinecke, W. Gutsche und K. Wohlrabe: Lambdamycin, ein Antibiotikum aus dem Stamm IMET 31118 von Streptomyces glaucoachromogenes Prauser. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 16, 521 - 528 (1976)

Franklin, T.J. and B. Higginson: Active Accumulation of Tetracycline by E. coli. Biochem. J. 116, 287 - 297 (1970)

Franklin, T. J. and G. A. Snow: Biochemistry of antimicrobial action. London: Chapman and Hall (1971)

Fraser, R.S. and J. Creanor: The mechanism of inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-Hydroxyquinoline and the antibiotic Lomofungin. Biochem. J. 147, 401 - 410 (1975)

Frobel, K.: Isolierung und Strukturaufklärung der Antibiotika aus Streptomyces Tü 929. Dissertation Universität Göttingen (1977)

Fuchs, E., R.L. Millette, W. Zillig and G. Walter: Influence of salts on RNA synthesis by DNA-dependent-RNA-polymerase from Escherichia coli. European J. Biochem. 3. 183 - 193 (1967)

Fukuda, R., A. Ishihama, T. Saitoh and M. Taketo: Comparative studies of RNA-polymerase subunits from various bacteria. Molec. gen. Genet. 154, 135 - 144 (1977)

Furukawa, M.: Structure of Kidamycin: X-ray analysis of Isokidamycin. Tetrahedron Lett. 37, 3287 - 3290 (1974)

Ghandi, N.M., J. Nazareth, P.V. Divekar, H. Kohl and N.J. de Souza: Magnesidin, a novel magnesium containing antibiotic. J. Antibiotics 26, 797 - 798 (1973)

Goldberg, H.S.: Nonmedical uses of antibiotics. Adv. Appl. Microb. 6, 91 - 117 (1964)

Goldberg, I.H. and P.A. Friedman: Antibiotics and Nucleic Acids. Ann. Rev. Biochem. 40, 775 - 810 (1971)

Goodman, R.N.: Uses of antibiotics in plant pathology and production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 747 - 756 (1966)

Gottlieb, D. and P.D. Shaw: Antibiotics I. Mechanism of action. Berlin und New-York: Springer-Verlag (1967)

Hagenmaier, H., K.H. Jaschke, L. Santo, M. Scheer und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 158. Mitteilung: Tirandamycin B. Arch. Microbiol. 109, 65 - 74 (1976)

Hanka, L.J. and S.A. Gerpheide: Chartreusin: Production and microbiological assay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 12, 571 - 572 (1977)

Hartmann, G., W. Behr, K.-A. Beissner, K. Honikel und A. Sippel: Antibiotica als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese. Angew. Chem. 18, 710 - 718 (1968)

Heil, A. and W. Zillig: Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. Febs Letters 11, 165 - 168 (1970)

Helm, K. von der and J. Krakow: Inhibition of RNA-polymerase by Streptolydigin. Nature New Biology 235, 82 - 83 and 240, 96 (1972)

Horváth, G., J. Gyimesi and Z. Méhesfalvi-Vajna: The structure of oleficin, a new polyenic antibiotic exhibiting antibacterial activity. Tetrahedron Lett. 36, 3643 - 3648 (1973)

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten. Bibl. Microbiol. 6. Basel: Karger (1967)

Iwakura, Y., A. Ishihama and T. Yura: RNA-polymerase mutants of Escherichia coli. II. Streptolydigin resistance and its relation to Rifampicin Resistance. Molec. gen. Genet. 121, 181 - 196 (1973)

Jaschke, K.H.: Antibiotika aus den Streptomycetenstämmen Tü 1240 und Tü 1306: Isolierung und Charakterisierung der Tirandamycine A und B. Dissertation Universität Tübingen (1977)

Jukes, T.H.: The present status and background of antibiotics in the feeding of domestic animals. In: The problems of drug-resistant pathogenic bacteria, pp. 362 - 379. Eds. E.L. Dulaney and A.J. Laskin. Annals of the New York Adademy of Sciences (1971)

Kanda, N.: A new antitumor antibiotic, Kidamycin. I. Isolation, purification and properties of Kidamycin. J. Antibiotics 24, 599 - 606 (1971)

Kersten, H. and W. Kersten: Inhibitors of nucleic acid synthesis. Biophysical and biochemical aspects. Berlin-Heidelberg-New-York: Springer-Verlag (1974)

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

Kohl, H., S.V. Bhat, J.R. Patell, N.M. Gandhi, J. Nazareth, P.V. Divekar, N.J. de Souza, H. G. Berscheid and H.W. Fehlhaber. Structure of Magnesidin, a new Magnesium-containing antibiotic from Pseudomonas magnesiorubra. Tetrahedron Lett. 37, 983 - 986 (1974)

Kondo, S., T. Wakashiro, M. Hamada, K. Maeda, T. Takeuchi and H. Umezawa: Isolation and chracterization of a new antibiotic, Neopluramycin. J. Antibiotics 23, 354 - 359 (1970)

Krakow, J.S., G. Rhodes and T.M. Jovin: RNA-polymerase: Catalytic mechanisms and inhibitors. In: RNA polymerase, pp. 127 - 157. Eds. R. Losick and M. Chamberlin. Cold Spring Harbor Laboratory (1976)

Kunze, B.: Lipomycine, neue polyenartige Antibiotika aus Streptomyces aureofaciens. Untersuchungen zur Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1975)

Leach, B.E., K.M. Calhoun, L.E. Johnson, C.M. Teeters and W.G. Jackson: Chartreusin, a new antibiotic produced by Streptomyces chartreusis, a new species. J. Amer. chem. Soc. 75, 4011 - 4012 (1953)

Lev, M.: Germ-free animals in laboratory uses. In: Antibiotics in agriculture, pp. 352 - 360. Ed. M. Woodbine. London: Butterworths (1962)

Lev, M., C.A.E. Briggs and M.E. Coates: Bacteriological studies of "infected" and "uninfected" chicks in relation to antibiotic growth stimulation. Nature 178, 1125 - 1126 (1956)

Lill, U., R. Santo, A. Sippel and G. Hartmann: Inhibitors of the RNA-polymerase-reaction. In: Inhibitors, tools in cell research. 20. Colloqu. d. Gesellschaft für Biologische Chemie, S. 48 - 59. Eds. T. Bücher and H. Sies. Berlin-Heidelberg-New-York: Springer-Verlag (1969)

Mac Kellar, F.A., M.F. Grostic, E.C. Olson, R.J. Wnuk, A.R. Bränfman and K.L. Rinehart, Jr.: Tirandamycin. I. Structure assignment. J. Amer. chem. Soc. 93, 4943 - 4945 (1971)

Mc Govern, J.P., G.L. Neil, S.L. Crampton, M.I. Robinson and J.D. Douros: Antitumor activity and preliminary drug disposition studies of Chartreusin (NSC - 5159). Cancer Res. 37, 1666 - 1672 (1977)

Maeda, K., T. Takeuchi, K. Nitta, K. Yagishita, R. Utahara, T. Osato, M. Ueda, S. Kondo. Y. Okami and H. Umezawa: A new antitumor substance, Pluramycin. J. Antibiotics 9, 75 - 81 (1956)

Mercer, H.C., D. Pocurull, S. Gaines, S. Wilson and J.V. Bennett: Characteristics of antimicrobial resistance of Escherichia coli from animals: Relationship to veterianry and management uses of antimicrobial agents. Appl. Microbiol. 22, 700 - 705 (1971)

Meronuck, R.A., J.A. Steele, C.J. Mirocha and C.M. Christensen: Tenuazonic-acid, a toxin produced by Alternaria alternata. Appl. Microbiol. 23, 613 - 617 (1972)

Meyer, C.E.: Tirandamycin, a new antibiotic. Isolation and characterization. J. Antibiotics 24, 558 - 560 (1971)

Nagy, Z. and Horváth, I.: Antibacterial effect of oleficin on Staphylococcus aureus strains. Acta Microbiologica Academiae Scientiarium Hungaricae 20, 28 (1973)

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

Pramer, D.: The status of antibiotics in plant desease control. Adv. Appl. Microb. 1, 75 - 85 (1959)

Pridham, T.G., P. Anderson, C. Foley, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesseltine and R.G. Benedict: A selection of media für maintenace and taxonomic study of Streptomyces. Antib. Ann. 947 - 953 (1956/57)

Pridham, T.G. and H.D. Tresner: Streptomycetaceae. pp. 747 - 845. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edition. Eds. R.E. Bucchanan and N.E. Gibbons. Baltimore: The Williams & Wilkins Company (1975)

Rabussay, D. and W. Zillig; A Rifampicin-resistant RNA-polymerase from E. coli altered in the ß-subunit. Febs Letters 5, 104 - 106 (1969)

Rembold, F.: Konservierung von Nahrungsmitteln durch Antibiotika. In: Die Antibiotika. II. Die mittleren Antibiotika pp. 789 - 815. Eds. R. Brunner und G. Machek. Nürnberg: Verlag Hans Carl (1965 a)

Rembold, F.: Antibiotika in der Tierernährung. In: Die Antibiotika. II. Die mittleren Antibiotika. pp. 708 - 788. Eds. R. Brunner und G. Machek. Nürnberg: Verlag Hans Carl (1965 b)

Reusser, F.: Tirandamycin: Inhibition af ribonucleic acid polymerase. Infect. Immun. 2, 77 - 81 (1970)

Reusser, F.: Tirandamycin, an inhibitor of bacterial ribonucleic acid polymerase. Antimicrobial Agents and Chemoterapy 10, 618 - 622 (1976)

Rinehart, K.L., Jr., J.R. Beck, W.W. Epstein and L.D. Spicer: Streptolydigin I-III. J. Amer. chem. Soc. 85, 4035 - 4039 (1963)

Sano, Y, N.Kanda and T. Hata: Iyomycin, a new antitumor antibiotic from Streptomyces. III. Isolation and properties of Iyomycin B. J. Antibiotics 17, 117 - 123 (1964)

Santo, L.: Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien. Tirandamycin A und B. Dissertation Universität Tübingen (1976)

Schabacher, K. und A. Zeeck: Lipomycine, II. Die Konstitution von ∝- und ß-Lipomycin. Tetrahedron Lett. 29, 2691 - 2694 (1973)

Schanz, D.: Antibiotika aus Aspergillus funiculosus. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1978)

Schleif, R.: Isolation and characterization of a Streptolydigin resistant RNA-polymerase. Nature 223, 1068 - 1069 (1969)

Schmitz, H., K.E. Crook, Jr. and J.A. Bush: Hedamycin, a new antitumor antibiotic. Antimicrobial Agents Chemoterapy, 606 - 612 (1966)

Séquin, U., C.T. Bedford, S.K. Chung and A.I. Scott: The structure of the antibiotic Hedamycin. I. Chemical, physical and spectral properties. Helv. Chim. Acta 60, 896 - 906 (1977)

Shigeura, H.T.: Tenuazonic-acid. In: Antibiotics I. Mechanism of action, pp. 360 - 365. Eds. D. Gottlieb and P.D. Shaw. Berlin-Heidelberg-New-York: Springer-Verlag (1967)

Siddhikol, C., J.W. Erbstoeszer and B. Weisblum: Mode of action of streptolydigin. J. Bact. 99, 151 - 155 (1969)

Simonitsch, E., W. Eisenhuth, O.A. Stamm und H. Schmid: Über die Struktur des Chartreusins. Helv. Chim. Acta 43, 58 - 63 (1960)

Smith, H.W.: Effect of prohibition of the use of tetracyclines in animal feeds on tetracycline resistance of faecal E. coli of pigs. Nature 243, 237 - 238 (1973)

Sonenshein, A., B. Cami, J. Brevet and R. Cote: Isolation and chracterization of Rifampin-resistant and Streptolydigin-resistant mutants of Bacillus subtilis with altered sporulation properties. J. Bacteriol. 120, 253 - 265 (1974)

Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Berlin-Heidelberg-New-York: Springer-Verlag (1967)

Stickings, C.E.: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 106. Metabolites of Alternaria tenuis Auct.: The structure of tenuazonic acid. Biochem. J. 72, 332 - 340 (1959)

Strauss, D.G. und W.F. Fleck: Lambdamycin, ein Antibiotikum aus dem Stamm IMET 31118 von Streptomyces glaucoachromogenes Prauser. II. Physikochemische Eigenschaften und Vergleich mit Chartreusin. Zeitschrift für allg. Mikrobiologie 17, 227 - 234 (1977)

Suzuki, H., J. Pangborn and W.W. Kilgore: Filamentous cells of Escherichia coli formed in the presence of Mitomycin. J. Bact. 93, 683 - 688 (1967)

"Swann-Report": Joint commitee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Report Command No. 4190, Her Majesty's Stationary Office, London (1969)

Thein, I. Suche nach neuen Antibiotika mit dem Testorganismus Clostridium pasteurianum. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie I Universität Tübingen (1974)

Thirumalacher, M.J.: Antibiotics in the control of plant pathogens. Adv. Appl. Microb. 10, 313 - 337 (1968)

Umezawa, H.: Index of antibiotics from Actinomycetes. Tokyo: Univeristy of Tokyo press (1967)

Walton, J.R.: Antibiotics, animals and R-factors in man. In: Bacterial plasmids and antibiotic resistance, pp. 91 - 94. Eds. V. Krcmery, L. Rosival and T. Watanabe. Berlin-Heidelber-New-York: Springer-Verlag (1972)

Weber, W. Desomycin, ein neuer, aminoglycosid-ähnlicher Hemmstoff der bakteriellen Proteinsynthese. Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1976)

Wehrli, W.: Ansamycins, chemistry, biosynthesis and biological activity. Topics in Current Chemistry. (Im Druck)

Wolf, H. und H. Zähner: Stoffwechselpordukte von Mikroorganismen. 99. Mitteilung: Kirromycin. Arch. Mikrobiol. 83, 147 - 154 (1972)

Yarbrough, L., F. Wu and C. Wu: Molecular mechanism of the Rifampicin-RNS-polymerase interaction. Biochemistry 15, 2669 - 2676 (1976)

Zähner, H.: Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. Ang. Chem. 89, 696 - 703 (1977)

Zähner, H. and W.K. Maas: Biology of antibiotics. New-York-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag (1972)

Zeeck, A.: Persönliche Mitteilung. Organisch-Chemisches-Institut der Universität Göttingen (1977)

Zeiler, H.J.: Stenothricin, ein neuer Hemmstoff der Mureinsynthese. Dissertation Universtität Tübingen (1974)

Zillig, W., P. Palm and A. Heil: Function and reassembly of subunits of DNA-dependent RNA-polymerase. In: RNA-polymerase, pp. 101 - 125. Eds. R. Losick and M. Chamberlin. Cold Spring Harbor Laboratory (1976)

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 11. 6. 1949 | geboren in Ulm-Söflingen |
| 1956 - 1960 | Volksschule Ulm-Söflingen |
| 1960 - 1968 | Humboldt-Gymnasium, Ulm |
| 30. 5. 1968 | Reifeprüfung am Humboldt-Gymnasium, Ulm |
| ab WS 1968/69 | Biologiestudium an der Universität Tübingen |
| 13.10. 1970 | Diplomvorprüfung in Biologie |
| 29. 3. 1974 | Diplomhauptprüfung in Biologie |
| | anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner. |

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, V. Braun, W. Frank, K.G. Grell,
J. Guglielmi, W. Haberlandt, K. Heckmann, V. Hemleben,
W. Kretschmar, H. Krüger, H. Lang, W. Löffler,
K. Mägdefrau, H. Metzner, G.F. Meyer, G. Mickoleit,
F.P. Möhres, K. Mörike, E. Müller, H. Pape, K. Pelling,
W. Rähle, A. Rieker, H. Ritter, W. Rüdorff, E.M. Sander,
J. Schmitt, U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle,
H. Seiler, W. Seyffert, G. Weitzel, U. Weser,
K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche